

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇAN İNFERİOR EPİGASTRİK ADA FLEBİ MODELİNDE ANTİOKSİDAN ÖN TEDAVİ ZAMANLAMASININ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ UZMANLIK TEZİ

Dr. CEMAL BURAK SİRKECİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ANIL DEMİRÖZ

İSTANBUL – 2024

T.C.

İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA

CERRAHPAŞA TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇAN İNFERİOR EPİGASTRİK ADA FLEBİ MODELİNDE ANTİOKSİDAN ÖN TEDAVİ ZAMANLAMASININ İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE ETKİSİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ UZMANLIK TEZİ

Dr. CEMAL BURAK SİRKECİ

TEZ DANIŞMANI

Doç. Dr. ANIL DEMİRÖZ

İSTANBUL – 2024

ÖNSÖZ

Asistanlık eğitimim boyunca bilgi ve becerilerinin yanı sıra tecrübelerinden büyük kazanç sağladığım ve yetişmemde sonsuz emekleri olan değerli hocalarım Sn. Prof. Dr. Oğuz ÇETİNKALE, Sn. Prof. Dr. Yağmur AYDIN, Sn. Prof. Dr. Arif TÜRKMEN, Sn. Prof. Dr. Hakan ARSLAN, Sn. Doç. Dr. Semih BAĞHAKİ, Sn. Doç. Dr. Anıl DEMİRÖZ ve Sn. Doç. Dr. Berrak KARATAN ve Sn. Doç. Dr. Alp ERCAN'a sonsuz teşekkürlerimi arz ederim.

Asistanlığım süresince benden destek, tecrübe, bilgi ve hoşgörülerini esirgemeyen sayın tez danışmanım Sn. Doç. Dr. Anıl DEMİRÖZ 'e, tez çalışması için yaptığı katkılardan dolayı İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa, Nanoteknoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü, Biyoteknoloji Anabilim Dalı'ndan Sn. Arş. Gör. Şima KILIÇ'a, tezim sürecinde yardımlarını esirgemeyen çalışma arkadaşlarım Dr. Shamil Suleymanov'a, Dr. Beşir Öner'e, Dr. Başak DAĞHAN'a, Dr. Koray TEMİZ'e, Dr. Uğur ÇELİK'e, Dr. Fatih ÇINAR'a, Dr. Servet Yekta AYDIN'a, Dr. Can Ege YALÇIN'a, Dr. Ersin YAVUZ'a, Dr. Serkan MELENKİŞ'e, Dr. Mehmet DEMİR'e, Dr. İsmail ÖZPÜR'e, Dr. Esra Zeynep KURTOĞLU'na, Dr. Emre Berk BULUT'a, Dr. Tolga SARIGÖZ'e, Dr. Levent DEMİR'e, Dr. Oğuz YILDIRIM'a, Dr. Çağlar YILMAZ'a, Dr. Melih SAĞIR'a, Dr. Furkan Taner OKUR'a, Dr. Oğuzhan KESKİN'e, Dr. Emre GÖK'e, Dr. Çağdaş BULUT'a, Dr. Berat Çalışkan'a , Dr. Sabit İlke RİZELİOĞLU'na, Dr. Alper GÜNEL'e ve Dr. İrem Okay TAŞCAN'a sonsuz teşekkür ederim. Plastik Cerrahi Kliniği hemşire, personel ve tüm çalışanlarına teşekkürlerimi sunarım.

Tüm hayatım boyunca desteklerini benden esirgemeyen sevgili annem Av. Aysel SİRKECİ'ye ve her zaman yanımda olan sevgili eşim Dr. Ecem GÜRELER SİRKECİ'ye sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Dr. Cemal Burak SİRKECİ

İstanbul 2024

İÇİNDEKİLER

SİMGE VE KISALTMALAR I
ŞEKİLLER DİZİNİ IV
TABLO DİZİNİ VII
GRAFİK DİZİNİ IX
ETİK KURUL ONAYI X
TEZ/PROJE FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ XII
ÖZET XIII
ABSTRACT XV
1.GİRİŞ I
2. GENEL BİLGİLER 4
2.1. FLEPLERİN TEMELİ 4
2.2. FLEP FİZYOLOJİSİ 15
2.3. FLEP PATOFİZYOLOJİSİ 17
2.4. SERBEST RADİKALLER 24
2.5. İNSAN VÜCUDUNUN SERBEST RADİKALLERE KARŞI SAVUNMA MEKANİZMALARI 26
2.6. FLEP CANLILIĞINI ARTTIRMAYA YÖNELIK CERRAHİ VE FARMAKOLOJİK MANİPÜLASYONLAR 27
2.7. ANTİOKSİDANLAR 34
2.8. TOTAL ANTİOKSİDAN KAPASİTE 42
2.9. SIÇAN İNFERIOR EPİGASTRİK ADA FLEBİ 44
3. GEREÇ VE YÖNTEM 48
3.1. HAYVANLARIN GRUPLANDIRILMASI VE TASNİFİ 49
3.2. ANTİOKSİDAN AJANLARIN HAZIRLANMASI VE ENJEKSİYONU 51
3.3. CERRAHİ PROSEDÜR 55
3.4. POSTOPERATİF 24. SAATTE KUYRUK VENİNDEN KAN ALIMI 65
3.5. POSTOPERATİF BAKIM 67
3.6. POSTOPERATİF DÖNEMDE ENJEKSİYONLARIN DEVAMI 69
3.7. FOTOĞRAFİK VERİLERİN ELDE EDİLMESİ 70
3.8. DOKU BIYOPSİLERİNİN ALINMASI 71
3.9. HAYVANLARIN SAKRİFİKASYONU VE İNTRAKARDİYAK KAN ALIMI 73
3.10. ELDE EDİLEN ÖRNEKLERİN SAKLANMASI VE TRANSFERİ 74
3.11. FOTOGRAFİK DEĞERLENDİRME 75
3.12. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME 77
3.13. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME 80
3.14. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME 81

4. BULGULAR 82
4.1. FOTOĞRAFİK İNCELEME BULGULARI.....82
4.2. HİSTOPATOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI.....88
4.3. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME BULGULARI.....106
5. TARTIŞMA.....119
6. SONUÇ 137
7. KAYNAKLAR.....138
8. EKLER 150
9. ÖZGEÇMİŞ 151
10. İNTİHAL TARAMA RAPORU.....155

SİMGE VE KISALTMALAR

µmol **:** mikromol

5HT2 **:** serotonin reseptörü (5HT2)

ABTS **:** 2,2’-azinobis

ADSC **:** adipöz doku kökenli kök hücreler

AOPP **:** ileri oksidasyon protein ürünleri

ATP **:** adenozintrifosfat

℃ **:** Santigrat derece

Ca2+ **:** kalsiyum iyonu

cAMP **:** siklik adenozin monofosfat

CE **:** klorpirifos-etil

cGMP **:** siklik guanozin monofosfat

cm : santimetre

cm² **:** santimetrekare

cNOS **:** yapısal nitrik oksit sentaz

Cu2+ **:** bakır iyonu

CUPRAC **:** kuprik indirgeme antioksidan kapasitesİ

eNOS : endotelyal nitrik oksit sentaz

Equv. **:** eşdeğer

ET-1 : endotelin-1

FGF **:** fibroblast büyüme faktörü

FRAP **:** ferrik iyon indirgeme antioksidan gücü

g : gram

GSH **:** glutatyon

GSH-P **:** glutatyon peroksidaz

H+ **:** hidrojen iyonu

H2O2 **:** hidrojen peroksit

HOCl **:** hipokloröz asit

IL-1β : interlökin 1 beta

iNOS **:** indüklenebilir nitrik oksit sentaz

ip. : intraperitoneal

IP3 **:** inozitol trifosfat

İR **:** iskemi-reperfüzyon

İRH **:** iskemi-reperfüzyon hasarı

kg : kilogram

L **:** litre

MDA **:** malondialdehit

MEC **:** melatonin, Vitamin E ve C

mg : miligram

mL : mililitre

MPO **:** miyeloperoksidaz

NADPH **:** nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NE **:** norepinefrin

NF- κβ : nükleer faktör kappa beta

ng : nanogram

nmol **:** nanomol

nmol : nanomole

NO **:** nitrik oksit

NOS **:** nitrik oksit sentaz

O2• **:** süperoksit radikali

OH• **:** hidroksil radikali

ORAC **:** oksijen radikal absorbsiyon kapasitesi

PDGF : Platelet derive büyüme faktörü

PGI2 : prostasiklin

pH **:** potansiyel hidrojen

PKC **:** protein kinaz C

ROS **:** reaktif oksijen türleri

rpm **:** dakikadaki devir sayısı

SF : %0,9 NaCl içeren steril serum fizyolojik

SOD **:** süperoksit dismutaz

TAC **:** total antioksidan kapasite

TBST **:** Twin Tampon Çözeltisi

TEAC **:** Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi

TNF-alfa **:** tümör nekroz faktörü-alfa

TRAM **:** transvers rektus abdominis myokutanöz

TRAP **:** toplam radikal yakalama antioksidan parametresi

TXA2 **:** tromboksan A2

VEGF : Vasküler endotelial büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. Deri ve subkutan dokuya ait vasküler pleksuslar

Şekil 2. Anjiozom konsepti

Şekil 3. Komşu perforazomlar arası doğrudan veya dolaylı akım

Şekil 4. Random Flep

Şekil 5. Aksiyel paternli flep

Şekil 6. Pediküllü ada flebi örneği

Şekil 7. Perforatör tipleri

Şekil 8. Süperşarje Flep

Şekil 9. Mathes ve Nahai sınıflandırmasına göre kas flebi tipleri

Şekil 10. Cormack ve Lamberty sınıflandırmasına göre fasyokütan flep tipleri

Şekil 11. Kompozit, Siamese, Konjoint ve Ardışık flepler

Şekil 12. V-Y ilerletme flebi

Şekil 13. Rotasyon flebi tasarımı

Şekil 14. Transpoziyon flebi örneği, Romboid flep

Şekil 15. Propeller hareketi

Şekil 16. Flep cerrahisinde vazospazm ve trombozun patogenezi

Şekil 17. Ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz enzim sistemleri aracılıklı İRH yolağı

Şekil 18. Hücre içi kalsiyum artışına bağımlı gelişen mekanizmalar

Şekil 19. Serbest radikal illustrasyonu

Şekil 20. Cerrahi geciktirme sonrası choke damarlarının açılması

Şekil 21. Serbest radikalin antioksidan madde tarafından indirgenmesi

Şekil 22. Vitamin C'nin moleküler yapısı

Şekil 23. Vitamin E tarafından hidroksil radikaline hidrojen atomu transferi

Şekil 24. Melatoninin kimyasal yapısı

Şekil 25. İnferior epigastrik ada flebinin damarsal anatomisi

Şekil 26. İnferior epigastrik ada flebinin standart şablon ile tasarımı

Şekil 27. Pediküllü inferior epigastrik ada flebi modeli

Şekil 28. Hayvanların her kafeste dörderli olarak bakımı

Şekil 29. Hayvanların tasnifi açısından kuyruklarının boyanması

Şekil 30. Hayvanların enjeksiyonlar öncesi tartılması

Şekil 31. Toz halinde melatonin
Şekil 32. Toz halindeki melatoninin hassas tartıda tartılması
Şekil 33. Toz halindeki melatoninin dimetil sülfoksit içerisinde çözdürülmesi
Şekil 34. Temin edilen Vitamin C
Şekil 35. Temin edilen Vitamin E
Şekil 36. Sol abdominal bölgeye intraperitoneal enjeksiyon
Şekil 37. Anestezi amaçlı kullanılan ketamin ve ksilazin formları
Şekil 38. Hayvanların operasyon öncesi tıraş edilmesi
Şekil 39. Kullanılan cerrahi aletler
Şekil 40. Cerrahi prosedür öncesi cerrahi sahanın alkol ile silinmesi
Şekil 41. Kalıp yardımı ile standardize flep sınırlarının çizimi
Şekil 42. Flep kaldırılırken loupe gözlük kullanımı
Şekil 43. Flebin medial, superior ve lateral kenardan insize edilip tabandan kaldırılması
Şekil 44. Kanamaların koter yardımı ile durdurulması, pedikülün flebe girdiği alanın gözlenmesi ve pedikülün çevre dokudan künt diseksiyonu
Şekil 45. Flebin alt kenar insizyonunu takiben pedikül diseksiyonunun tamamlanması
Şekil 46. Femoral paketin diseksiyonu amacıyla mikroskop kullanımı
Şekil 47. Pedikülün distalinde femoral arter ve venin diseke edilmesi
Şekil 48. Murphy dalının koterize edilmesi
Şekil 49. Pedikülün proksimalinde femoral arter ve venin diseke edilmesi, ardından femoral paketin tabandan serbestlenmesi
Şekil 50. Pedikülün proksimaline ve distaline mikroklemp yerleştirilmesi
Şekil 51. 5-0 naylon keskin iğne uçlu sütür materyali
Şekil 52. Flebin yerine adapte edilmesi
Şekil 53. Mikroklemplerin çıkarılması ve reperfüzyon sonrası cilt altı dokudaki renk değişimi
Şekil 54. Milking testi ile akımın salim olduğunun tayini
Şekil 55. Operasyon sonrası gazlı bez ve file sargı ile pansuman
Şekil 56. Kuyruk veninden kan alımı
Şekil 57. Biyokimya tüplerinin dik olarak bekletilmesi ve ardından santrifüj edilmesi
Şekil 58. Santrifüj sonrası serum eldesi ve sonrasında eppendorf tüpler içerisinde -80 derecede saklanması

Şekil 59. Koban bandaj ile abdominal bölgenin sarılması
Şekil 60. File pansumanın ön bacak kısmının çıkarılması
Şekil 61. Postoperatif takipte flep alanlarına zarar veren hayvanlar
Şekil 62. Postoperatif dönemde hayvanların tekli kafeslerde takip edilmesi
Şekil 63. Postoperatif dönemde i.p. enjeksiyonlara devam edilmesi
Şekil 64. Standart fotoğraf çekimi için sağlanan düzenek
Şekil 65. Ötenazi öncesi standart fotoğraf çekimi
Şekil 66. Transizyon alanının hemen proksimalinden, medialden histopatoloji örneğinin, lateralden biyokimya örneğinin alınması
Şekil 67. Doku örneklerinin %10 formalin solüsyon içeren kaplarda saklanması
Şekil 68. Doku örneklerinin eppendorf tüplere koyulması
Şekil 69. İntrakardiyak kan alımı
Şekil 70. Örneklerin -80 derecede saklanmasını sağlayan soğutucu
Şekil 71. Biyokimya örneklerinin tasnifi ve kuru buz içerisinde transferi
Şekil 72. Image J programında piksel referansının alınması
Şekil 73. Toplam flep alanının hesaplanması
Şekil 74. Nekroz alanlarının ayrı ayrı hesaplanması
Şekil 75. Doku örneğinin hematoksilen ve eozin ile boyama kesiti
Şekil 76. Doku örneğinin Mason Trikrom ile boyanması ve mavi boyanan kollajen yapısı
Şekil 77. İmmünhistokimyasal boyamaya ait kesit

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. İnsan Vücudunun Antioksidan Enzimleri

Tablo 2. Shapiro Wilk Testi ile Toplam Flep Alanlarının Değerlendirilmesi

Tablo 3. Levene Testi- Toplam flep alanları

Tablo 4. ANOVA Testi – Toplam Flep Alanı

Tablo 5. Gruplar arası çoklu karşılaştırma – Toplam flep alanları

Tablo 6. Nekroz oranları ve varyansları

Tablo 7. Levene Testi – Nekroz Oranları

Tablo 8. Gruplar arası çoklu karşılaştırma – Nekroz oranları

Tablo 9. Gruplara göre HE boyama kesitleri, x100 büyütme

Tablo 10. HE boyama skorlama sonuçları

Tablo 11. HE skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Tablo 12. Gruplara göre MS boyama kesitleri, x100 büyütme

Tablo 13. MT boyama skorlama sonuçları

Tablo 14. MT skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Tablo 15. Gruplara göre eNOS boyama kesitleri, x100 büyütme

Tablo 16. eNOS boyama skorlama sonuçları

Tablo 17. eNOS skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Tablo 18. Gruplara göre Kaspaz 3 boyama kesitleri, x100 büyütme

Tablo 19. Kaspaz 3 boyama skorlama sonuçları

Tablo 20. Kaspaz 3 skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Tablo 21. Gruplara göre IL1 beta boyama kesitleri, x100 büyütme

Tablo 22. IL1 beta boyama skorlama sonuçları

Tablo 23. IL1beta skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Tablo 24. Gruplara göre VEGF boyama kesitleri, x100 büyütme

Tablo 25. VEGF boyama skorlama sonuçları

Tablo 26. VEGF skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Tablo 27. Postoperatif 24. Saat TAC değeri sonuçları
Tablo 28. Postoperatif 24. Saat TAC düzeyleri açısından istatistiksel analiz
Tablo 29. Ötenazi öncesi TAC değeri sonuçları
Tablo 30. KR grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi
Tablo 31. İR grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi
Tablo 32. İ7 grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi
Tablo 33. İY grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi
Tablo 34. RY grubu için TAC düzeyi değişimi açısından Wilcoxon işaretli sıralar testi
Tablo 35. SOD düzeyleri açısından istatistiksel analiz
Tablo 36. GSH düzeyleri açısından istatistiksel analiz
Tablo 37. MPO düzeyleri açısından istatistiksel analiz
Tablo 38. MDA düzeyleri açısından istatistiksel analiz
Tablo 39. AOPP düzeyleri açısından istatistiksel analiz

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1. Gruplara göre toplam flep alanı ortalamaları
Grafik 2. Gruplara göre toplam flep alanı dağılımı
Grafik 3. Gruplara göre nekroz oranı ortalamaları
Grafik 4. Grafiklere göre nekroz oranı dağılımı
Grafik 5. HE boyama skorlama sonuçları
Grafik 6. MT boyama skorlama sonuçları
Grafik 7. eNOS boyama skorlama sonuçları
Grafik 8. Kaspaz 3 boyama skorlama sonuçları
Grafik 9. IL1 beta boyama skorlama sonuçları
Grafik 10. VEGF boyama skorlama sonuçları
Grafik 11. Gruplara göre postoperatif 24. Saat TAC düzeyi dağılımı
Grafik 12. Ötenazi öncesi TAC düzeyi dağılımı
Grafik 13. KR grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları
Grafik 14. İR grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları
Grafik 15. İ7 grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları
Grafik 16. İY grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları
Grafik 17. RY grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları
Grafik 18. Gruplara göre SOD düzeyi dağılımı
Grafik 19. Gruplara göre GSH düzeyi dağılımı
Grafik 20. Gruplara göre MPO düzeyi dağılımı
Grafik 21. Gruplara göre MDA düzeyi dağılımı
Grafik 22. Gruplara göre AOPP düzeyi dağılımı

ETİK KURUL ONAYI

Tarih ve Sayı: 07.12.2023-856231

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ-CERRAHPAŞA
REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurul Başkanlığı

Sayı : E-74555795-050.01.04-856231 07.12.2023
Konu : 2023/43 Sayılı Etik Kurul Onayı

Sayın Doç. Dr. Anıl DEMİRÖZ

İlgi : 17.10.2023 tarihli proje başvurunuz.

Sorumluluğunu üstlendiğiniz **Uzmanlık öğr. Dr. Cemal Burak SİRKECİ**'nin "*Sıçan İnferior Epigastrik Ada Flebi Modelinde Antioksidan Ön Tedavi Zamanlamasının İskemi- Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi*" başlıklı **"Tıpta Uzmanlık Tezi"** projeniz Etik Kurulumuzun **27.10.2023** tarihli toplantısında görüşülmüş olup, **2023/43 No'lu** Etik Kurulu Onay formu ilişikte gönderilmiştir.

Gereği için bilgileriniz rica olunur.

Prof. Dr. Pınar ATUKEREN
Başkan

Ek:1 Etik Kurul Onayı

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

Belge Doğrulama Kodu :BSDPM4UEAZ Belge Takip Adresi : https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-cerrahpasa-ebys

Adres:İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü, 34320 Avcılar-İstanbul
Telefon:0212 404 03 00 Faks:0212 404 07 01
Web:https://www.iuc.edu.tr
Kep Adresi:iuc@hs01.kep.tr

Bilgi için: Canan SÖNMEZTÜRK

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

T.C.
İSTANBUL ÜNİVERSİTESİ CERRAHPAŞA
HAYVAN DENEYLERİ YERELETİK KURULU BAŞKANLIĞI
KARAR FORMU

Tarih ve Sayı: 07.12.2023-849488

Başvuru Tarihi: 17.10.2023

Toplantı Karar No:2023/43

İlgili Makama;

İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Öğretim Üyesi **Doç. Dr. Anıl DEMİRÖZ'ün** yürütücülüğünü üstlendiği Uzmanlık öğr. Dr. Cemal Burak SİRKECİ'ın "*Sıçan İnferior Epigastrik Ada Flebi Modelinde Antioksidan Ön Tedavi Zamanlamasının İskemi- Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi*" başlıklı "**Tıpta Uzmanlık Tezi"** başvurusu ile "İÜC Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kuruluna" başvurmuş olup, Kurulumuzun **27.10.2023** tarihinde gerçekleştirilen toplantısında incelenmiş ve Etik Kurul ilkelerine uygun bulunmuştur.

Ünvanı / Adı / Soyadı	Kurumu	Raportörün araştırma İle ilişkisi	Karar
Prof. Dr. Pınar ATUKEREN (Başkan)	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Prof. Dr.Çağatay TEK (Başkan Vekili)	İÜC Veteriner Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Prof. Dr. Hasret YARDİBİ	İÜC Veteriner Fakültesi	E ○ H ☑	○ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ☑ M.Katılmadı
Prof. Dr. Erdinç DURSUN	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Prof. Dr. Hakan ARSLAN	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Doç.Dr. Şenol EMRE	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	○ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ☑ M.Katılmadı
Doç.Dr. Halit Eren Taşkın	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Dr. Öğr. Üyesi Tuğçe BORAN	İÜC Eczacılık Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Dr. Öğr. Üyesi Hüseyin BEŞİROĞLU	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Öğr. Gör.Dr. Bilge BATU OTO	İÜC Cerrahpaşa Tıp Fakültesi	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Arş. Gör. Şima KILIÇ (Sorumlu Veteriner Hekim)	İÜC Nanoteknoloji ve Biyoteknoloji Enstitüsü	E ☑ H ○	○ Onay ☑ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı
Mim. Güzin AYDIN	Sivil Toplum Kuruluşu üyesi TC vatandaşı	E ○ H ☑	○ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ☑ M.Katılmadı
Uzm. Dr. Muzaffer Onur ŞERAN (Veteriner Hekim)	Sivil üye	E ○ H ☑	☑ Onay ○ Katılmadı ○ Ret ○ M.Katılmadı

İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Rektörlüğü, 34320 Avcılar-İstanbul
Tel : (0 212)) 4040300/16601-16602
Web:https://www.iuc.edu.tr
Kep Adresi:iuc@hs01.kep.tr

Bilgi için: Canan SÖNMEZTÜRK
Zeynep CÖMERT

Bu belge, güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
Evrak doğrulaması https://www.turkiye.gov.tr/istanbul-universitesi-cerrahpasa-ebys?eD=BSUPRRA752&eS=849488 adresinden yapılabilir.

Bu belge,güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.

TEZ/PROJE FİNANSAL DESTEK BİLDİRİMİ

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37605

ÖZET

Sıçan İnferior Epigastrik Ada Flebi Modelinde Antioksidan Ön Tedavi Zamanlamasının İskemi-Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi

Amaç: Serbest flep cerrahisi, rekonstrüktif cerrahide önemli bir yere sahiptir. Cerrahi tekniklerde ilerlemelere rağmen, vasküler komplikasyonlara bağlı gelişen iskemi-reperfüzyon hasarı (İRH), flep kayıplarına yol açabilmektedir. İRH'yi azaltmak amacıyla çeşitli cerrahi yöntem ve farmakolojik tedaviler geliştirilmiştir. Bu yöntemler arasında antioksidan tedaviler dikkat çekmektedir, ancak zamanlamasına ilişkin bir çalışma bulunmamaktadır. Bu çalışma, antioksidan ön tedavi zamanlamasının etkilerini araştırarak, bu eksikliği gidermeyi amaçlamaktadır.

Gereç ve yöntem: Bu çalışmada, 40 erkek Wistar Albino sıçan, beş gruba ayrıldı. Gruplar ; iskemi reperfüzyon (İR) uygulanmayan kontrol grubu, serum fizyolojik enjeksiyonu yapılan İR grubu, İR oluşturulan ve melatonin, Vitamin C, E içeren antioksidan ön tedavisi sırasıyla operasyondan 7 gün önce, iskemiden yarım saat önce ve reperfüzyondan yarım saat önce başlanan üç ayrı tedavi grubu olarak belirlendi. Tüm gruplarda 6x3 cm^2 boyutlarında inferior epigastrik ada flebi kaldırıldı ve 8 saat iskemiye maruz bırakıldı. Nekroz oranlarını hesaplamak amacıyla flep fotoğrafları çekildi. Total antioksidan kapasiteyi ölçmek için kan örnekleri alındı; histopatolojik ve biyokimyasal analizler için doku örnekleri toplandı.

Bulgular: Operasyondan 7 gün önce antioksidan ön tedavi uygulanan grubun, İR uygulanan gruplar arasında en düşük nekroz oranına (%6,3) sahip olduğu tespit edildi. Tüm histopatolojik ve immünohistokimyasal değerlendirmeler bu grup lehine istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar gösterdi. Ancak, gruplar arasında total antioksidan kapasite veya diğer biyokimyasal parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı.

Sonuç: Bu çalışma, antioksidan ön tedavisinin 7 gün önce başlanmasının diğer başlangıç zamanlamalarına göre flep yaşabilirliği açısından daha etkili olduğunu göstermiştir. Bu sonuç, özellikle elektif serbest flep operasyonları öncesi

uygulanabilecek olan, standart bir antioksidan ön tedavi algoritması geliştirilmesine katkı sağlamaktadır.
Anahtar kelimeler: *flep cerrahisi, iskemi-reperfüzyon, antioksidan ön tedavi*

Bu çalışma, İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir. Proje numarası: 37605

ABSTRACT

Evaluation of the Effect of Antioxidant Pretreatment Timing on Ischaemia-Reperfusion Injury in the Rat Inferior Epigastric Island Flap Model

Aim: Free flap surgeries represent significant advancements in reconstructive surgery. Despite surgical progress, ischemia-reperfusion injury (IRI) due to vascular complications remains a challenge, potentially leading to flap loss. Various strategies, including surgical methods and pharmacological treatments, have been explored to mitigate IRI. Among these, antioxidant treatments have garnered interest, but research on the optimal timing of antioxidant administration is lacking. This study addresses this gap by investigating the timing of antioxidant pretreatment.

Material and Method: In this study, 40 male Wistar Albino rats were divided into five groups: a control group with no ischemia-reperfusion (IR), an IR group with saline injections, and three treatment groups pretreated with melatonin, vitamin C, and vitamin E (10 mg/kg, 200 mg/kg, and 40 mg/kg, respectively), starting 7 days preoperatively, 30 minutes before ischemia, and 30 minutes before reperfusion. A 6 × 3 cm^2 epigastric island flap was elevated and subjected to 8 hours of ischemia. Blood samples were taken to assess total antioxidant capacity, flap photographs were taken to calculate necrosis rates, and tissue biopsies were collected for histopathological and biochemical analyses.

Results: Results showed that the group receiving antioxidant pretreatment 7 days before surgery had the lowest necrosis rate (6.3%) among the IR groups. Histopathological and immunohistochemical evaluations (VEGF, caspase-3, eNOS, and IL-1 beta) favored this group. However, biochemical parameters did not show significant intergroup differences.

Conclusion: Initiating antioxidant pretreatment 7 days prior to surgery significantly enhances flap viability, highlighting the importance of timing for optimal outcomes in elective free flap procedures.

Keywords: *flap surgery, ischaemia-reperfusion, antioxidant pretreatment*

This study was funded by Scientific Research Projects Coordination Unit of Istanbul University-Cerrahpasa. Project number: 37605

1.GİRİŞ

Serbest organ, doku nakilleri ve replantasyon işlemleri tıp biliminin insanlığa kazandırdığı en büyük ayrıcalıklardandır. Yüksek enerjili travmalar, çeşitli tümör rezeksiyonları ve doğumsal anomaliler, geniş yumuşak doku defektlerine sebep olabilir. Bu defektlerin onarımında genellikle plastik ve rekonstrüktif cerrahlar tarafından serbest doku nakilleri gerçekleştirilir (1). Ayrıca, çeşitli travmalar sonrası gelişen ampütasyonlarda, mikrocerrahi prosedürler dahilinde replantasyon işlemleri uygulanır.

Gelişen cerrahi ve teknolojik gelişmelere bağlı flep cerrahisinde başarı yüzdesi yükselmesine rağmen, komplikasyonlar her operasyonda gelişebilir. En önemli komplikasyonlardan biri, vasküler beslenme yetersizliğine bağlı total ya da parsiyel flep kayıplarıdır. İskemi-reperfüzyon hasarı da vasküler yetersizlik sonrası gelişen flep kaybına neden olan önemli bir fenomendir. Flep kayıplarına veya replantasyon başarısızlıklarına bağlı olarak artmış hasta morbiditesi ve mortalitesine neden olur ve uzamış hastanede yatış süresine bağlı olarak da total maliyet artar (2). Bu nedenle flep cerrahisi ile uğraşan cerrahların, iskemi- reperfüzyon hasarının patofizyolojisine ve olası tedavi seçeneklerine hakim olması gerekir.

İskemi, vücudun spesifik bir bölgesinde yetersiz kan akımının bulunması durumudur. Primer iskemi, replantasyon öncesi amputatın yaşadığı veya serbest flep operasyonlarında damar anastomozu gerçekleştirilmeden önce gelişen iskemidir. Bu yüzden flep cerrahisinde ve replantasyon işlemlerinde iskemi ve reperfüzyon hadisesi doğal bir durumdur. Sekonder iskemi ise operasyon sonrası komplikasyonlara veya flep pedikülünün yetersizliğine bağlı gelişen iskemidir. Komplikasyonlardan en önemlisi anastomoz problemleri ve trombozdur. Diğer nedenlere hematom, alıcı damar yetersizliği ve hiperkoagülopati, ateroskleroz gibi sistemik faktörler örnek gösterilebilir. Anastomoz revizyonu sağlanır veya diğer faktörler giderilirse dokuda reperfüzyon gelişir (3).

Reperfüzyon sonrası flep dokusunda lokal enflamasyon gelişir ve serbest radikallerden olan reaktif oksijen türlerinin üretimi artar. Artmış nitrik oksit seviyeleri

nedenli damar permeabilitesi artar. Dokulara nötrofil transmigrasyonu gerçekleşir. Nötrofillerden solunumsal patlama nedeniyle serbest oksijen türleri salgılanır. Serbest oksijen türleri potent oksidan özelliğe sahip olan ajanlardır. Hücre membranlarında lipid peroksidasyonu meydana getirerek direkt hücre hasarı meydana gelir (4). Uzamış iskemi-reperfüzyon tarafından indüklenen hücre hasarı da hücrelerde apoptoz, otofaji veya nekroza neden olarak flep hasarlarına yol açar.

Oksidatif stresi veya uzun süreli iskemi sonrası gelişen reperfüzyon hasarını minimize etmek amaçlı çeşitli metod ve teknikler tanımlanmıştır. İskemik ön koşullandırma, farmakolojik tedaviler, kök hücre tedavileri, cerrahi geciktirme gibi yöntemler bunlardan birkaçıdır. Dokuya ait iskemik ön koşullandırma teknikleri günümüzde altın standart olarak kabul edilir (5). Ancak uygulama zorlukları nedeniyle klinik pratikte sık uygulanmaz. Bu sebepten ötürü yeni bir yöntem arayışıyla, literatürde özellikle antioksidan maddelerin kullanıldığı farmakolojik tedavilere ait yayınlar sıklıktadır. Klinik uygulamaya ait ortak bir kabul bulunmayıp, klinik araştırmalar da kısıtlıdır.

Literatürde, iskemi reperfüzyon hasarını işleyen oldukça fazla hayvan modeli çalışması yayınlanmıştır. İnferior epigastrik pedikül bazlı ada flebi modelinin yanı sıra renal, testis, beyin ve kardiyak iskemi-reperfüzyon modelleri de diğer tıp bilim dalları tarafından kullanılmıştır. Bu çalışmalarda çeşitli antioksidan maddelerin doku yaşayabilirliğine olan katkısı değerlendirilmiştir. Vitamin C(6,7), Vitamin E(8), Melatonin(9), Fucoidin(10), Koenzim Q10(11), Kafeik asit fenilester(12), taurine(13), ekstrasellüler süperoksit dismutaz(14), çinko(15), montelukast (16), allopurinol(17), D-allose(18), Sulfatid(19), S-nitrisso(20), üzüm çekirdeği ekstresi(21), Likopen(6), Proxeed plus(22) gibi madde ve antioksidanların flep yaşayabilirliğine olumlu etkileri gösterilmiştir.

Klinik pratikte, elektif serbest flep operasyonları öncesi belirli bir hasta hazırlık süreci bulunmaktadır. Bu süreç içerisinde hastalara antioksidan ön hazırlık tedavisi verilmesi mümkündür. Ancak günümüze dek hem başlangıç zamanı hem de etken madde açısından standardize bir algoritma oluşturulamamıştır. İskemi ve reperfüzyon hasarı konusunu araştıran deneysel çalışmalarda da antioksidan maddeler genellikle operasyondan 1-2 hafta önce(6,21), iskemiden hemen önce(18) veya reperfüzyondan hemen önce(7) uygulanmıştır. Farmakolojik ön tedavi başlangıç zamanlamalarının, flep canlılığına veya total antioksidan kapasiteye etkisine yönelik karşılaştırma içeren

herhangi bir çalışma literatürde mevcut değildir. Literatürdeki bu boşluk, bu çalışmanın ana konusunu oluşturmaktadır.

Bu araştırmada, sıçan inferior epigastrik pedikülü bazlı ada flebi üzerinde iskemi reperfüzyon hasarı modeli işlenmiştir. Bu modelde sıçanlara intraperitoneal olarak daha önceden etkinliği kanıtlanmış antioksidanlar olan Vitamin C, E ve melatonin kombinasyonu uygulanmıştır. Farklı gruplara farklı tedavi başlangıç zamanlarında antioksidan ön hazırlık başlanmıştır. Böylece, farklı tedavi başlangıç zamanlamasının total antioksidan kapasite ve flep yaşayabilirliği üzerine etkileri ve farklı bir deyişle iskemi-reperfüzyon hasarını önlemeye ait etkileri değerlendirilmiştir. Sonuç olarak, özellikle elektif serbest doku nakli operasyonları öncesi standart bir antioksidan ön hazırlık tedavisin belirlenmesine katkıda bulunulması ve bu konuda yeni klinik çalışmaların önünün açılması hedeflenmiştir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Fleplerin Temeli

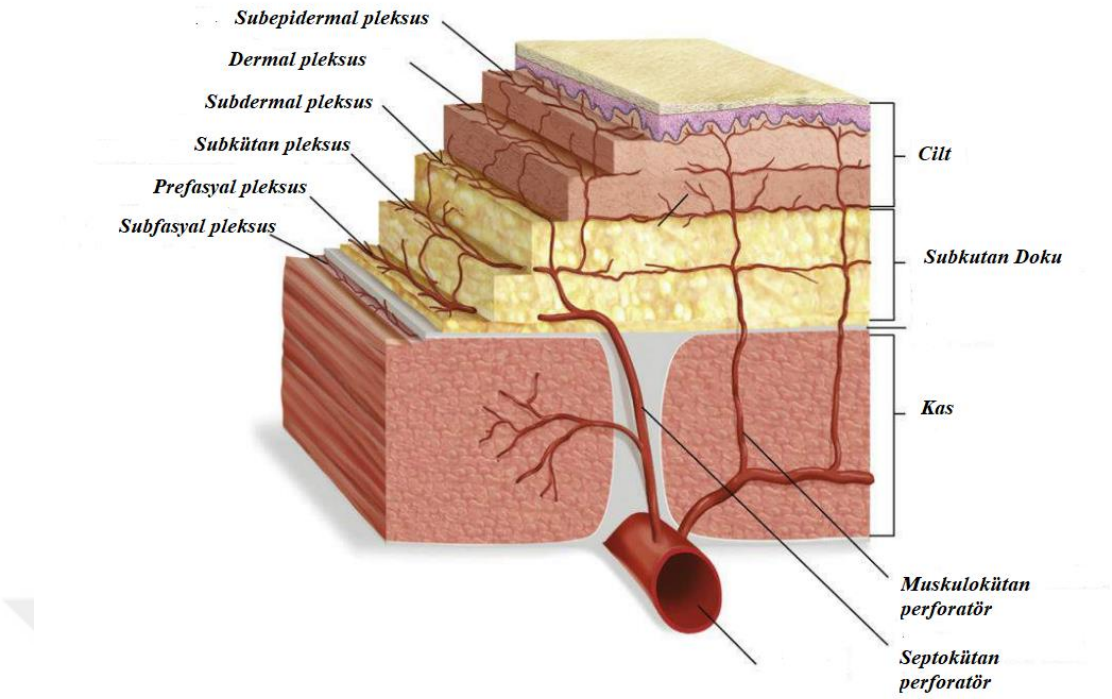
2.1.1. Flep Tanımı

Flepler, en basit tanımla donör alandan kaldırılıp alıcı alana transfer edildiği zaman kendi kanlanmasını sürdüren doku üniteleridir. Bu özelliği sayesinde, flepler, greftlerden ayrılır. Flepler, rekonstrüktif cerrahinin temelini oluşturur (23). Son yıllarda, özellikle vasküler anatominin anlaşılmasındaki gelişmeler nedeniyle, flepler hakkındaki bilgiler farklı bir seviyeye evrilmiştir. Bu durum, mevcut rekonstrüktif seçeneklerde kayda değer ilerlemelere yol açmıştır.

2.1.2. Fleplerin Kanlanma Fizyolojisi

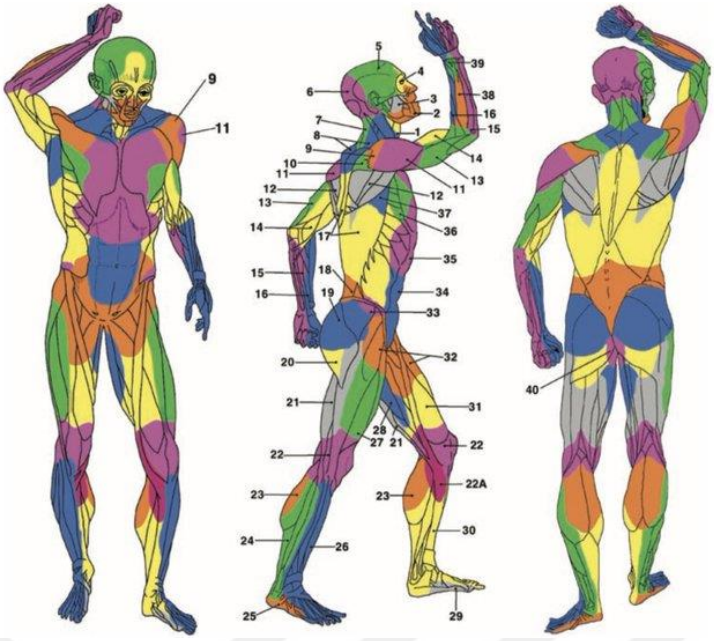
Fleplerin kaldırılmasının ve transferinin güvenli bir şekilde sağlanması için, flebe ait deri ve eşlik eden diğer dokuların kanlanma fizyolojisi çok iyi bilinmelidir. Derinin sahip olduğu termoregülasyon, homeostaz ve immünolojik fonksiyonlar nedeniyle kendi metobolizmasına göre daha fazla kanlanmaya sahiptir (24). Bu durum, deri fleplerinin viabilitesini arttırır.

Derinin kanlanması, isimli damarların, kasları, septaları veya fasyaları geçerek ilerleyen perforatör ismi verilen dalları ile sağlanır. Bu perforatör damarlara eşlik eden venlerle birlikte yüzeyel vasküler pleksuslar oluşur (Şekil 1). Subepidermal, dermal, subdermal, subkutan, perifasyal ve subfasyal pleksuslar bu vasküler pleksuslara örnek olarak verilebilir. Bu pleksuslar birbirleri ile bağlantılar oluşturarak, derinin tüm katmanlarının kanlanmasını sağlayan üç boyutlu bir damar ağı oluşturur. Deride kanlanma, suprafasyal ve subdermal tabakalarda yoğunlaşmıştır (25).



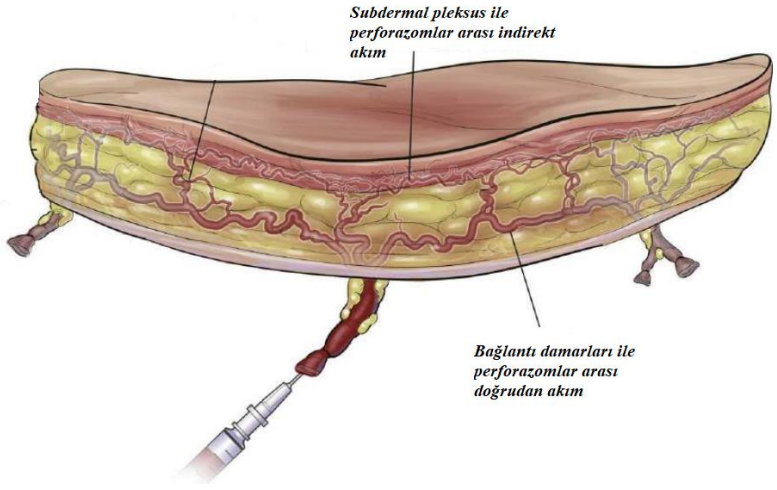
Şekil 1. Deri ve subkutan dokuya ait vasküler pleksuslar(1)

1987 senesinde Taylor ve Palmer deri ve altındaki dokuların kanlanması hakkında anjiozom konseptini ortaya çıkarmıştır (26). Anjiozom konseptine göre; deri ve altındaki derin dokudan oluşan kompozit ünite, bir arterial kaynak ve ona eşlik eden venler tarafından kanlanır. Bu konsept uyarınca, vücut yüzeyi üzerinde birbirine choke anastomotik damarları (27) ile bağlı birbirinden farklı boyutlarda, 40 adet anjiozom tanımlanmıştır (Şekil 2).



Şekil 2. Anjiozom konsepti(1)

Saint-Cyr ve arkadaşlarının daha yakın tarihli çalışmaları, flep tasarımında önemli olan vasküler bölge ve akış özelliklerine daha pratik bir bakış açısı sağlamak için, anjiozom kavramını geliştirmiştir. 3 boyutlu (statik) ve 4 boyutlu (dinamik) kan akımının birden fazla perforatör üzerinden incelenmesi ve kanlanma sağlanan bölgenin haritalandırılması üzerine perforazom konsepti oluşturulmuştur. Haritalanma sonrası beklenenden daha büyük bir karmaşıklık saptanmıştır. Her perforazomun, hem doğrudan (fasyal) hem de dolaylı (subdermal) bağlantı sağlayan damarlarla, komşu bir perforazom ile ilişkili olduğu doğrulanmıştır (28).

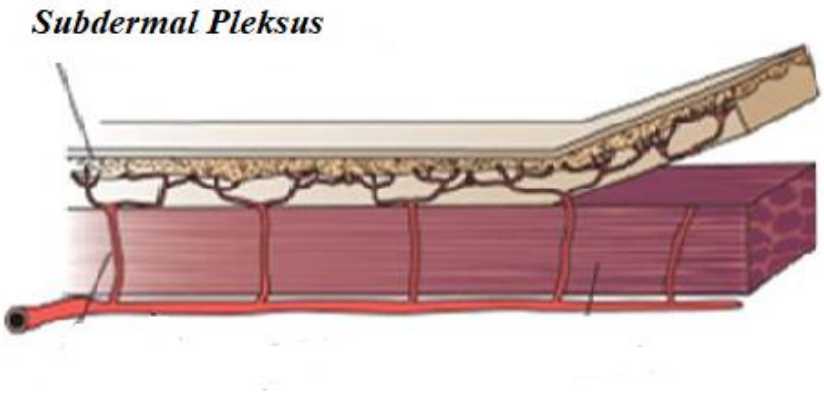


Şekil 3. Komşu perforazomlar arası doğrudan veya dolaylı akım (1)

2.1.3. Flep Sınıflandırılması

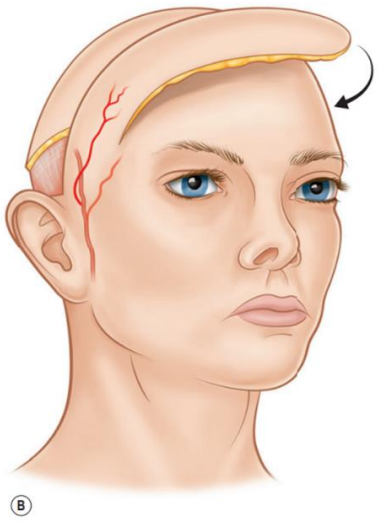
Flep cerrahisinin başladığı günden itibaren sınıflandırmaya ait birçok çalışma yapılmış olsa da günümüzde flepleri sınıflandırmak için uygun, basit ve herşeyi sınıflandıran bir sistem yoktur (29). Güncel olarak, sınıflandırma yöntemleri kusursuz olmasa da, plastik ve rekonstrüktif cerrahların ortak bir dilde iletişim kurmaları için flep sınıflandırılması önemlidir. Flepler çeşitli sınıflara ayrılabilir. Ancak; günümüzde en çok vasküler kaynağına, doku kompozisyonuna, transfer yöntemine ve lokasyonuna göre sınıflara ayrılır (1).

Flepler vasküler kaynağına göre; random flepler, aksiyel flepler, ters akımlı flepler, pediküllü flepler, serbest flepler, perforator flepler, venöz flepler ve superşarje flepler olarak adlandırılabilir. Random flepler, belirli damarlar üzerinden dizayn edilmeyen ve bu nedenle, perfüzyonu subdermal pleksus tarafından rastgele paternde sağlanan fleplerdir (Şekil 4). Random flepler, vücudun bölgelerine göre değişse de, geleneksel olarak 3:1 uzunluk:genişlik oranı ile tasarlanırlar (30).



Şekil 4. Random Flep (31)

Flebin longitüdinal aksı boyunca uzanan isimlendirilmiş bir arter içeren flepler ise aksiyel paternli fleplerdir (Şekil 5). Bu nedenle, random paternli fleplere göre daha fazla uzunluk:genişlik oranı ile tasarlanabilirler (32). Aksı boyunca uzanan arterin adı ile ilgili flepler isimlendirilir.



Şekil 5. Aksiyel paternli flep (2)

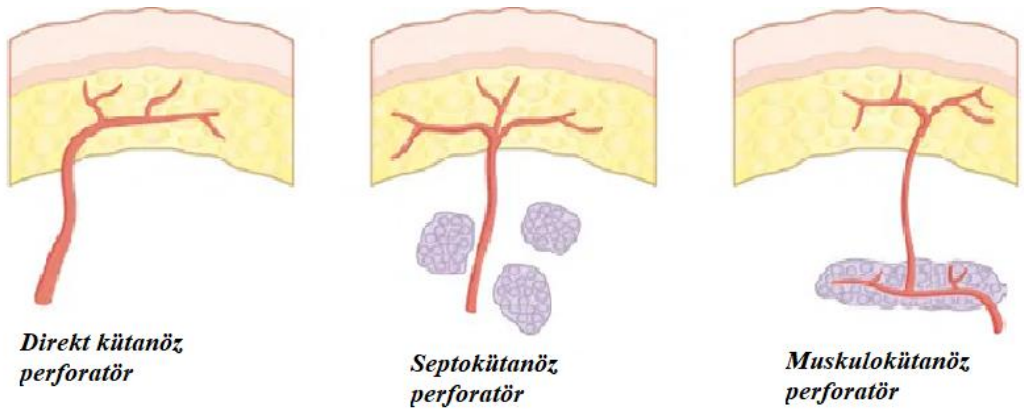
Ters akımlı flepler ise aksiyel flepler olup; proksimalde dominant vasküler kaynak bağlanmıştır. Distalde başka bir ana vasküler kaynakla bağlantılı damarlardan, flebe kan akımı sağlanır. En çok kullanılan ters akımlı fleplerden biri, ters akımlı radial ön kol flebidir. İlgili flep ile rekonstrüksiyon planlandığında, proksimalde radial arter bağlanır ve akım distalde palmar arktan sağlanır (33).

Pediküllü flepler, bilinen bir doğal vasküler kaynağa, diğer bir deyişle pediküle, bağlı olarak kaldırılan fleplerdir (Şekil 6). İlgili fleplerin hareket mesafesi, bu damarların sağladığı rotasyon veya ilerleme arkları ile sınırlıdır. Pedikül çevre dokulardan serbestçe diseke edilip, flep adalaştırılarak, hareket mesafesi maksimize edilebilir. Serbest flepler ise, pediküllü fleplerden farklı olarak, vasküler kaynağı ile birlikte alıcı alana transfer edilir. Alıcı alanda mikrocerrahi teknikler kullanılarak flebin pedikülü alıcı damarlara anastomoze edilir. Böylece, yeni kan akımı sağlanır. Serbest flepler rekonstrüktif merdivenin en üstünde yer alır ve rekonstrüktif cerrahlar açısından doku transferi anlamında büyük bir özgürlük sağlar (34).



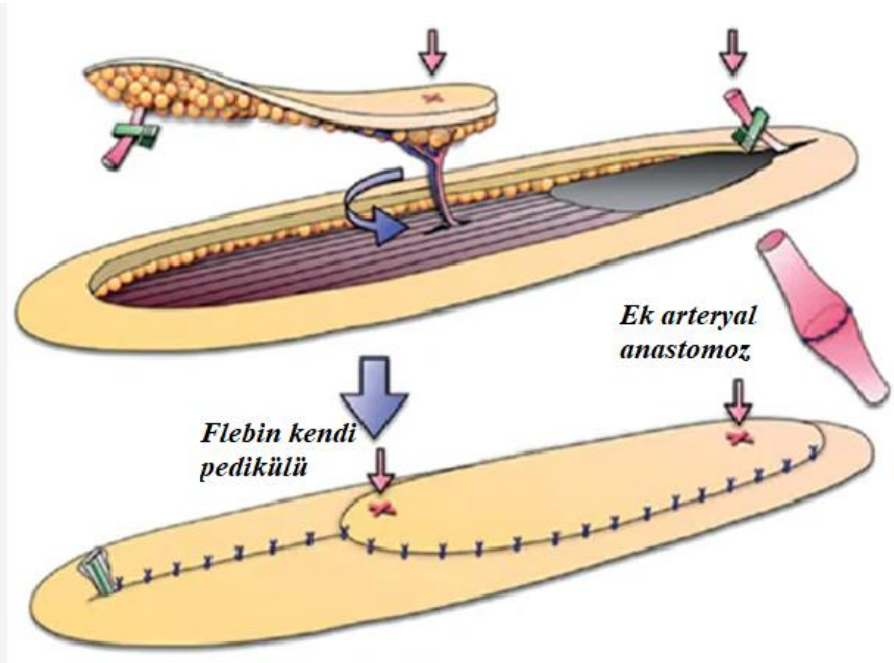
Şekil 6. Pediküllü ada flebi örneği (2)

Perforatör flepler, adlandırılmış bir damardan gelen perforan bir artere dayalı olan ve bu perforatör tarafından perfüze edilen, 3 boyutlu doku üniteleridir. Perforatör damarlar, ana damardan dallanıp derin dokuların arasından veya içinden geçerek deriye ulaşır. Perforatör damarlar deriye ulaşma tiplerine göre üçe ayrılır: Myokütan perforatörler, Septokütan perforatörler ve Direkt kütanöz perforatörler (Şekil 7). Perforatör flep tasarımı yapılırken ilgili perforanların deriye giriş yerleri Doppler ultrasonografi ile belirlenebilir. Fleplerin hareket mesafesinin arttırılması amacıyla perforator diseksiyonuna ek olarak ana pedikül diseksiyonu da yapılır (35). Perforatör flepler, genellikle besleyici arterin adına göre isimlendirilir. Örnek olarak; derin inferior epigastrik arter perforator flebi verilebilir. Sayısız donör alan imkanı, kas fonksiyonlarının korunması ve minimal donör alan morbiditesi, perforator fleplerin avatajı iken; zor pedikül diseksiyonu, olası anatomik varyasyonlar ve kas-deri fleplerine oranla nekroz oranında artış, dezavantajları olarak gösterilebilir (36).



Şekil 7. Perforatör tipleri (37)

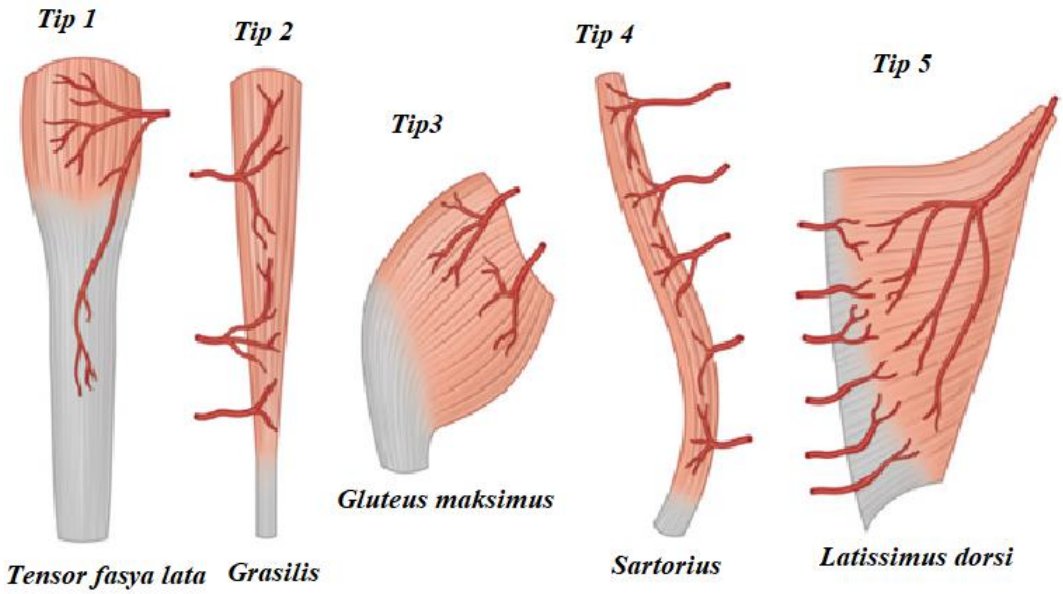
Venöz flepler, deri, subkutan doku ve bir ven pleksusunun kompozisyonundan oluşur. Cilt flepleri, venöz bir pedikül tarafından beslenir. Flep içerisinde arteriyel bir komponent bulunmaz. Genel olarak flebin veni proksimalde bir artere, distalde ise bir vene anastomoze edilir. Böylece flep içine ve dışına kan akımı sağlanmış olur. İlgili flepler genellikle küçüktür, konjesyona ve parsiyel kayıplara eğilim gösterir. Klinik pratikte el cerrahisi alanında kullanımı sıktır, lokal fleplere alternatif olarak kullanılır (38). Arteryal girişi ve venöz çıkışı olan bir flebe ek anostomoz uygulanarak arteryal veya venöz destek sağlanması durumunda ise flepler, superşarje flep olarak isimlendirilir (Şekil 8). Mikrocerrahi teknikler kullanılarak flebe ekstra bir arter veya ven anastomozu eklenir (39).



Şekil 8. Süperşarje Flep (40)

Fleplerin bir diğer sınıflama konusu, içerdikleri doku kompozisyonudur. Fleplerin içermesi gereken doku üniteleri, defektin rekonstrüksiyon gereksinimlerine göre belirlenir. Flepler içerdikleri doku ünitelerine göre; kutanöz, fasyakutanöz, fasya, kas, myokutanöz, osseöz, osteokutanöz, osteomyokutanöz veya visseral flepler olarak adlandırılabilir. Ayrıca, kemik, deri, fasya veya kas gibi farklı doku komponentlerini içeren birbiri ile ilişkili ünitelere sahip fleplere de bileşik flep ismi verilir (41).

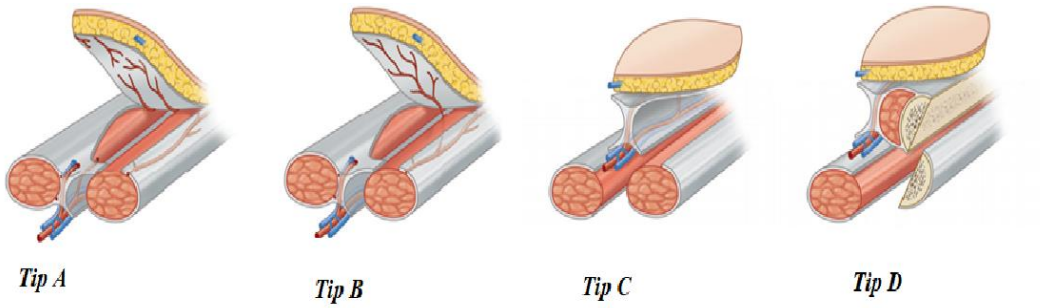
Kas flepleri, rekonstrüktif cerrahide sık kullanılan fleplerdendir. Deri komponenti ile birlikte myokutanöz olarak veya üzerine deri grefti adapte edilerek kas flebi olarak rekonstrüksiyonda kullanılabilir. Mathes ve Nahai 1981 yılında kas fleplerini kanlanma tiplerine göre sınıflara ayırmıştır (42). Tip 1 kas flepleri, tek bir vasküler pediküle sahiptir. Tip 2 kas flepleri, tek dominant pediküle sahip olup en az bir minör pedikül daha mevcuttur. Vücutta en sık bulunan tiptir. Flep minör pediküle bağlı yaşayamaz. Tip 3 kas flepleri, iki ayrı dominant pediküle saptir ve bu iki ayrı pediküle bazlı olarak flep kaldırılabilir. Tip 4 kas flepleri, segmental pediküller bulundurur. Kas boyunca birçok pedikül kasa girer ve her biri kasın bir kısmını besler. En az güvenilir olan kas flebi tipidir. Tip 5 kas flepleri ise, bir dominant pedikül ve sekonder segmental pediküllere sahiptir (Şekil 9). Flep segmental pediküllere bağlı olarak da kaldırılabilir (23).



Şekil 9. Mathes ve Nahai sınıflandırmasına göre kas flebi tipleri (43)

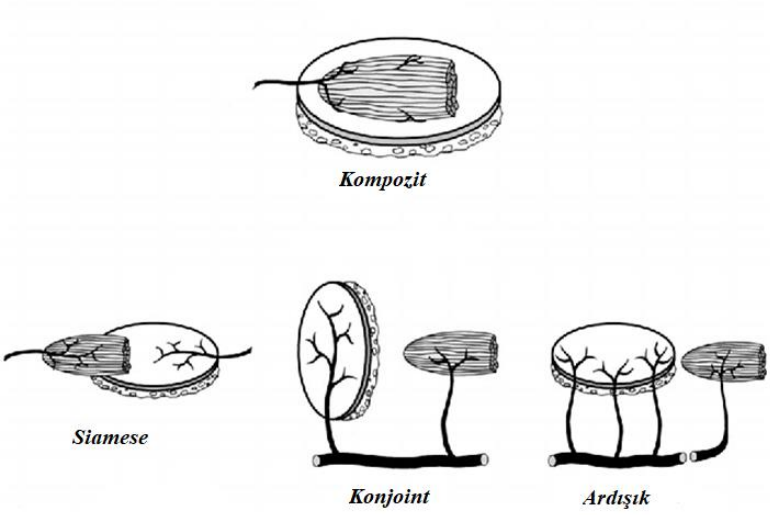
Deri, subkutan doku ve fasyayı içeren flepler, fasyakütan fleplerdir. Rekonstrüktif cerrahide kompleks defektlerin onarımında kullanılırlar. 1984 senesinde

Cormack ve Lamberty fasyokütan flepleri tiplere ayırmıştır (Şekil 10). Tip A flepler, çoklu kodominant fasyakütan perforatör içeren fleplerdir. Tip B flepler, tek bir dominant fasyakütan perforare sahiptir. Tip C flepler, tek veya çoklu septokütan perforatör içerir. Tip D flepler ise, kaynak damarı seyri boyunca kas veya kemik gibi farklı üniteleri de içerebilen fasyakütan fleplerdir (44).



Şekil 10. Cormack ve Lamberty sınıflandırmasına göre fasyokütan flep tipleri (2)

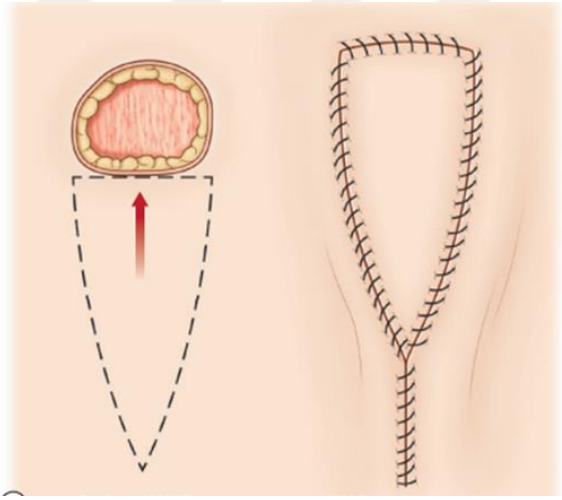
Bileşik flepler de kendi içerisinde tek vaskülerize ve miks vaskülerize bileşik flepler olarak ikiye ayrılır. Tek vasküler kaynaktan köken alan multipl doku komponentleri bulunan flepler kompozit flep olarak adlandırılır. Miks vaskülarize bileşik fleplere; siamese, konjoint ve ardışık flepler örnek olarak verilebilir. Çoklu flep komponenti, ortak fiziksel bağlantı, bağımsız vasküler destek içeren flepler siamese fleplerdir. Konjoint flepler ise, çoklu doku komponenti, birbirinden bağımsız dokular, bağımsız vasküler destek ancak ortak ana pedikül içerir. Son olarak, ardışık flepler, multipl flep komponentine, birbirinden bağımsız dokulara, bağımsız vasküler desteğe sahiptir. Ardışık flepler birbirine mikroanastomozlar ile bağlanır(41).



Şekil 11. Kompozit, Siamese, Konjoint ve Ardışık flepler (45)

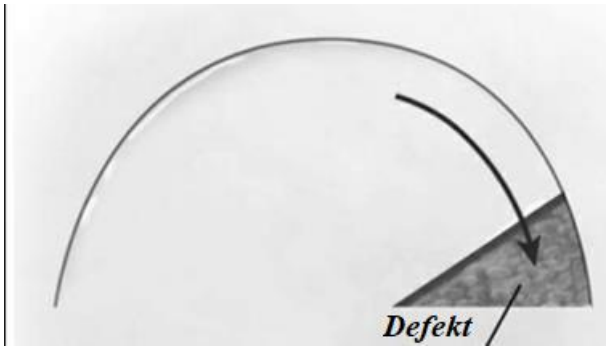
Fleplerin sınıflandırılmasında kullanılan bir diğer özellik, fleplerin lokasyonudur. Bu sınıflamaya göre flepler, defekte olan uzaklığına göre ayrışırlar. Flepler, lokasyonuna göre; lokal flepler, rejyonal flepler ve uzak flepler olmak üzere üçe ayrılır. Lokal flepler, defekte komşu alandan alıcı alana transfer edilen fleplerdir. Genelde; ilerletme, rotasyon, transpozisyon, interpolasyon veya bu hareketlerin kombinasyonu ile alıcı alana transfer edilir. Rejyonel flepler ise, defekte komşu değildir; ancak defekt ile aynı anatomik bölgede yer alır. Lokal fleplere göre, alıcı alana taşınırken daha uzun hareketler gerektirir. Çoğunlukla, pediküllü flepler tercih edilir. Son olarak uzak flepler, vücudun başka bir bölgesinden alıcı alana taşınan fleplerdir. En önemli örneği serbest fleplerdir (46).

Flepler, hareketine veya transfer yöntemine göre de sınıflandırılabilir. Genellikle lokal veya rejyonal flepler hareketine göre sınıflandırılır. Sık kullanılan flep hareket türlerine; ilerletme, rotasyon, transpozisyon, interpolasyon ve pediküllü fleplerin propeller hareketi örnek olarak verilebilir. İlerletme flepleri, belli bir doğrultuda kaydırma veya germe yoluyla ilerletilir (Şekil 12). Deri esnekliği önemlidir. Tek pediküllü veya bipediküllü ilerletme tercih edilebilir. En sık kullanılan iletletme fleplerinden biri V-Y ilerletme flebidir (41).



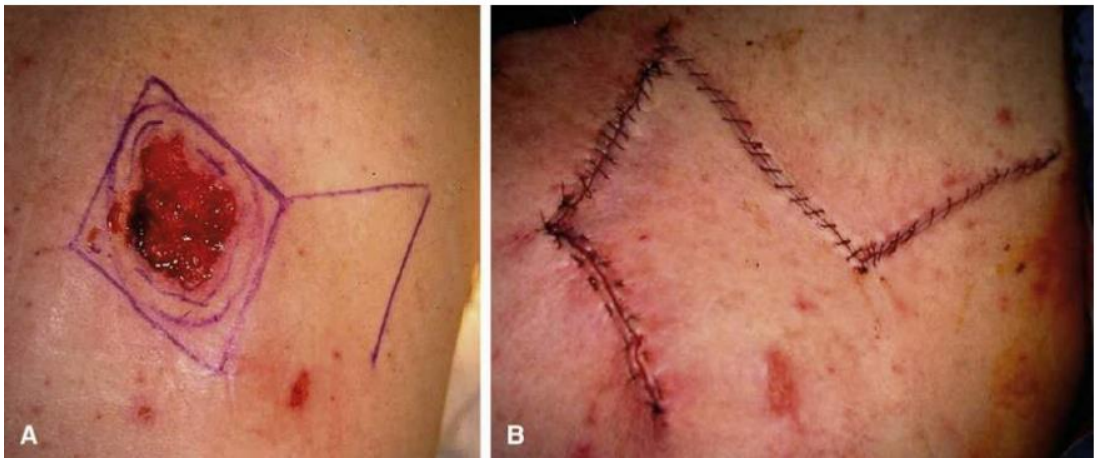
Şekil 12. V-Y ilerletme flebi (2)

Rotasyon flepleri, defektin komşuluğundaki yarım daireden kaldırılır ve pivot nokta etrafında semisirküler bir şekilde döndürülür (Şekil 13). Flebin yarı çapının uzunluğu, defektin yüksekliğinin bir ile iki katı arasında olmalıdır. Gerginliksiz kapama için flebin tabanına rahatlatma insizyonu yapılabilir.



Şekil 13. Rotasyon flebi tasarımı (1)

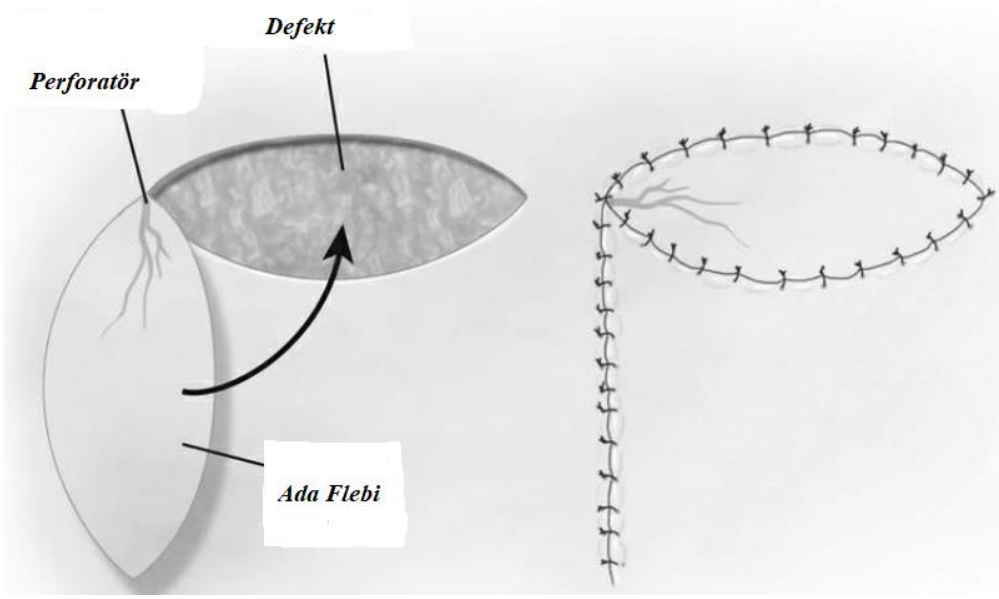
Transpozisyon flepleri, pivot nokta etrafında yana doğru döndürülen fleplerdir (Şekil 14). Flebin efektif uzunluğu döndürüldüğünde kısalır; bu nedenle flep defektten uzun tasarlanmalıdır. Donör alan, primer, deri grefti ile veya sekonder flep ile kapatılabilir. Sık kullanılan transpozisyon fleplerine, z-plasti flepleri, romboid flep, bilobe flep ve Dufourmentel flep örnek, olarak verilebilir (23).



Şekil 14. Transpoziyon flebi örneği, Romboid flep (1)

İnterpolasyon flepleri, pivot nokta etrafında defekte doğru döndürülen ancak defekte komşu olmayan fleplerdir. Flebin defekte adaptasyonu amacıyla pedikül aradaki dokunun altından veya üstünden geçer. Sık kullanılanın interpolasyon flepleri; geleneksel alın flebi ve deltopektoral fleplerdir (47).

Propeller hareketi, ada haline getirilmiş pediküllü perforatör fleplere özgü bir harekettir. İlgili flepler, belli derecede pervane benzeri dönme hareketi yapar ve bu sayede defekte adapte edilir (48). Flebin pivot noktası, pedikülün flebe girdiği yer olarak belirlenir (Şekil 15).



Şekil 15. Propeller hareketi (1)

2.2. Flep Fizyolojisi

Bir flebin kaldırılmasıyla birlikte meydana gelen en belirgin olumsuz değişiklik, vasküler kaynağın kısmen kesilmesi nedeniyle ilgili deriye kan akışının önemli ölçüde azalmasıdır. Uygun şekilde tasarlanmış bir flebin, ortaya çıkan iskemiye rağmen hayatta kalabilme yeteneği, yalnızca derinin düşük besin gereksinimlerine değil, aynı zamanda derinin içindeki kollateral kan akışının önemine de bir kanıt niteliğindedir. Bir flebe ait kan akışındaki değişiklikleri etkileyen ek faktörler arasında; sempatik denervasyon, lokal enflamatuar değişiklikler ve alıcı yatakta gelişen neovaskülarizasyon da yer alır (49).

Bir kutanöz flep kaldırıldığında, o deri segmentine doğrudan kan akışı kesilir. Bu kesinti, ilgili deriye olan perfüzyon basıncının düşmesine neden olur. Random patern flepler, kaldırılan deri flebinin tabanından gelen vasküler kaynağa bağımlıdır. Perfüzyon basınçları, flebin tabanından uzaklaştıkça daha da azalır. Perfüzyon basıncı dermal-subdermal pleksus içindeki arteriollerin kritik kapanma basıncının altına düştüğünde, distal dokulara kan akımı durur. Flep distaline tekradan kan akımı sağlanmadıkça flebin distal bölümünde, nekroz izlenir (50). Ancak; kutanöz yapılar içindeki birbirine bağlı choke damarları aracılığıyla sağlanan geniş kollateral akım, perfüze olmayan alanlara komşu dokulardan yeterli desteği sağlar. Bu durum, çoğu flebin, alıcı yataktan revaskülarizasyonu gerçekleşene kadar canlı kalabilmesini sağlar. Vasküler yetersizlikle ilgili olarak dikkate alınması gereken bir diğer faktör ise

venöz yetersizliktir. Her ne kadar bir flebin venöz yetersizliği, yetersiz arteriyel perfüzyondan daha zararlı olma potansiyeline sahip olsa da, yalnızca subdermal pleksus genellikle venöz akım için yeterli olur (49).

Fleplerin kaldırılması, yalnızca kutanöz duyusal innervasyonun değil, aynı zamanda ilgili dokuların sempatik innervasyonunun da kesintiye uğramasına neden olur. Sempatik sinirlerin kesilmesi, sinir uçlarından katekolaminlerin salınmasına ve nörotransmitter geri alımının bozulmasına yol açar. Bu durum, hiperadrenerjik bir ortam oluşturup lokal vazokonstriksiyona neden olur (51). Bu vazokonstriksiyon, vücut içerisindeki homeostatik mekanizmaların bir parçası olarak, delici bir yaralanma sonrası kan kaybını en aza indirmektedir. Fakat, bu durum, zaten çevresel insizyon sonrası akımı kısıtlı olan cilt flebinde besleyici kan akımının daha da azalmasına neden olmaktadır. Adrenerjik nörotransmitter seviyeleri 24 ila 48 saat sonra azaldığında ise, flebi besleyen damar ağlarının vazodilatasyonu gerçekleşir. Sempatektomi sonrası gelişen vazodilatasyon, cerrahi geciktirme fenomeni yoluyla da flep canlılığını artırmak için kullanılan mekanizmalardan birisidir (52).

Flepler kaldırıldığında veya herhangi bir yumuşak doku hasarı oluştuğunda, inflamatuar bir yanıt oluşur. Bu yanıt, histamin, serotonin ve kininler gibi inflamatuar mediyatörlerin ekstraselüler salınımı ile akut olarak sağlanır. İlgili maddeler, damar geçirgenliğinde bir artışa neden olur ve bunun sonucunda ekstraselüler ortamda inflamatuar hücrelerin ve proteinlerin konsantrasyonunda bir yükselme meydana gelir. Ortaya çıkan doku ödemi, akut fazda zaten akımı azalmış flebin perfüzyonunu daha da azaltabilir. Ancak inflamatuar yanıt, lokal vazodilatasyona neden olan prostaglandin sentezinin başlatılmasına da yol açar. Böylece, inflamasyonun etkileri, fleplerin viabilitesi üzerinde hem olumlu hem de olumsuz etkilere sahip olabilir (53).

Bir flep, alıcı yatağına transfer edildikten sonra, neovaskülarizasyon sonucu, kan akımı kademeli olarak ilk birkaç gün içinde artar. Bu süreç yaklaşık 3 ila 4. günlerde başlar ve genellikle 7. günden sonra flep pedikülünden ayrılabilecek duruma gelir. Neovaskülarizasyonun meydana geldiği mekanizmalar belirsizdir; ancak büyük olasılıkla hem anjiyojenik (mevcut kapiler ağdan yeni damarların oluşumu) hem de vaskülojenik (kemik iliği kaynaklı endotelyal progenitor hücrelerden yeni damar oluşumu) süreçleri içerir (49). Doku iskemisi varlığında, temel fibroblast büyüme faktörü ve vasküler endotelyal büyüme faktörü gibi büyüme faktörlerinin salınımı, endotelyal hücrelerin ve endotelyal progenitor hücrelerin proliferasyonunu ve yeni

kapiler kanallar oluşumunu uyarır. Kapiller neovaskülarizasyon, damarların flebin çevresindeki dokulardan iskemik gradyan boyunca içe doğru büyümesi ile karakterizedir. Yeni kapiler büyüme, anjiyojenik bir uyarana doğru yaklaşık günde 0.2 mm hızında gerçekleşir ve neovaskülarizasyon sonunda 2 mm ila 5 mm mesafelerine ulaşır (53).

2.3. Flep Patofizyolojisi

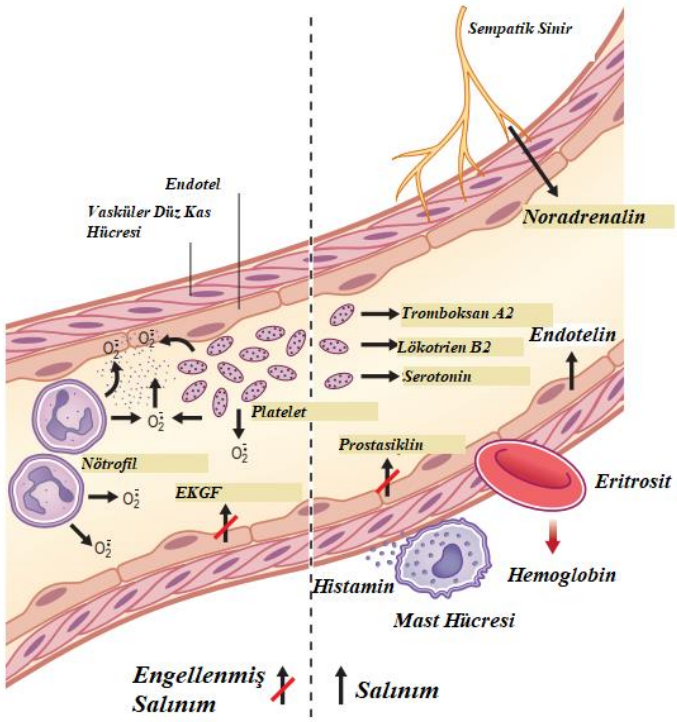
2.3.1. Flep Patofizyolojisine Giriş

Flep cerrahisi, travma, tümör eksizyonu veya doğuştan gelen malformasyonlar nedeniyle oluşan defektlerin onarımı için sıkça başvurulan bir yöntemdir. Ancak, pediküllü ve serbest fleplerin iskemik nekroz nedeniyle başarısızlığı, klinik uygulamalarda ciddi bir sorun yaratır. İskemik nekroz, serbest fleplerin %5-10'unda, deneyimli cerrahlar tarafından uygulansa bile ortaya çıkabilir (54). Flebin nekrozu parsiyel veya tam olabilir. Bu durum tekrarlayan cerrahi müdahaleler, uzun hastane yatışları ve yüksek maliyetler ile sonuçlanır (55). Bu nedenle, flep cerrahisinde iskemik nekrozun patofizyolojisinin anlaşılması, flep başarısızlığını önlemek veya tedavi etmek için etkili farmakolojik ve cerrahi uygulamaların geliştirilmesi için önemlidir.

2.3.2. Vazospazm ve Tromboz

Klinik ve deneysel çalışmalar, iskemik nekrozun genellikle hem pediküllü hem de serbest fleplerin distal kısmında meydana geldiğini göstermektedir. Genel görüş, cerrahi travma ve yetersiz distal vaskülarite nedeniyle vazospazm ve trombozun flep başarısızlığının ana patolojik faktörleri olduğu yönündedir. Ancak, bu patolojik mekanizma hakkında sınırlı bilgi bulunmaktadır. Bununla birlikte, periferik vasküleritenin lokal düzenlenmesinde nörohumoral maddeler büyük bir rol oynamaktadır (2). Endotel kaynaklı gevşetici faktörlerden olan prostasiklin (PGI2) ve nitrik oksit (NO), vasküler düz kasın gevşemesine ve trombosit agregasyonunun inhibisyonuna yol açar. Diğer yandan, endotel kaynaklı kasıcı faktörlerden olan tromboksan A2 (TXA2) ve endotelin-1 (ET-1), vasküler tonusu artırır. Normal fizyolojik koşullarda, endotel kaynaklı gevşetici faktörler ve endotel kaynaklı kasıcı faktörler arasındaki denge, yeterli doku perfüzyonunu sağlar. Ancak, cerrahi travma gibi durumlarda bu denge bozulabilir (56).

Cerrahi travma sonrası, sempatik sinir uçlarından norepinefrin (NE) salınması, vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonuna yol açar. Ayrıca, sempatik sinir uçlarından salınan NE, trombositlerden salınan lökotrienler, serotonin (5HT2) ve TXA2 ile travmaya uğramış vasküler endotel hücrelerinden salınan ET-1, özellikle flebin distal kısmındaki arteriollerde vazokonstriksiyona ve intravasküler trombosit agregasyonuna neden olabilir. Hemolize olmuş kırmızı kan hücrelerinden (örn. hematom) salınan hemoglobin de güçlü bir vazokonstriktördür. Mast hücrelerinden salınan histamin, membran geçirgenliğini değiştirerek ödem oluşumuna yol açar. Ayrıca, travmaya uğramış vasküler endotel hücrelerinden PGI2 ve NO'nun sentezi ve salınımı azalır. Endotel fonksiyonunun bozulduğu durumlarda, NE ve 5HT2'nin yıkım hızları da azalır (2). Sonuç olarak, cerrahi travma sırasında lokal düzeyde yüksek konsantrasyonlarda vazokonstriktif ve protrombotik nörohumoral maddeler bulunur ve bu maddeler, flep cerrahisinde vazospazmı şiddetlendirir ve trombozu teşvik eder (Şekil 16). İskemi sonrası reperfüzyon geliştiğinde ise, trombositler, nötrofiller ve endotel hücreleri tarafından üretilen süperoksit radikalleri (O2•) gibi serbest radikaller oluşarak iskeminin yarattığı hasara ek olarak iskemi reperfüzyon hasarı meydana gelir (3).



Şekil 16. Flep cerrahisinde vazospazm ve trombozun patogenezi (2)

2.3.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı

Fleplerin doku perfüzyonu, flep takibindeki en kritik parametredir. Perfüzyon belirli bir süre kesildiğinde ve yeniden sağlandığında, iskemi-reperfüzyon hasarı (İRH) meydana gelir. Zamanında reperfüzyon sağlandığında, iskemi, geri dönüşümlü hücresel hasarına neden olur. Ancak, belirli bir süre sonra kan akışının yeniden sağlanması, iskeminin neden olduğu hasardan daha büyük bir doku hasarına yol açar. İRH, biyokimyasal, hücresel ve vasküler faktörler arasındaki karmaşık bir etkileşimin sonucu oluşur. İRH durumunda oluşan doku hasarı, iskemi hasarı ve reperfüzyon hasarı olmak üzere iki aşamadan oluşur (5).

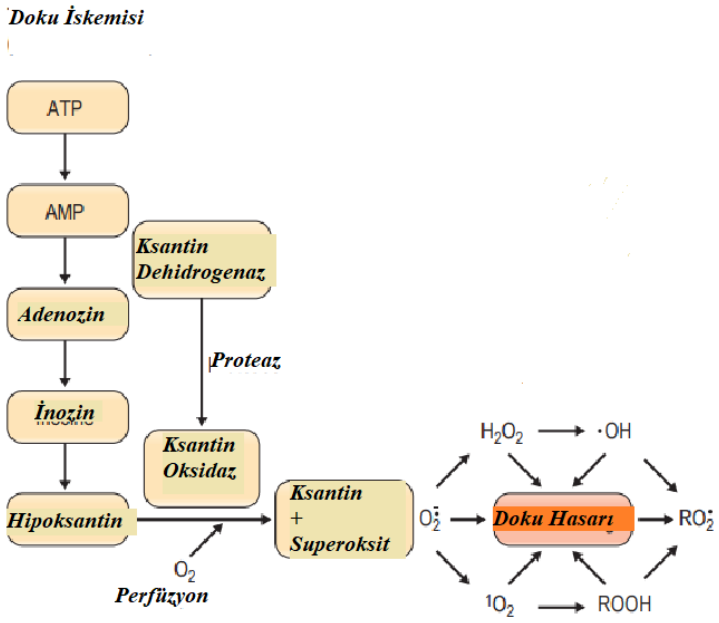
İskemi, vücudun spesifik bir bölgesinde yetersiz kan akımının bulunması durumudur. Primer iskemi, replantasyon öncesi amputatın yaşadığı veya serbest flep operasyonlarında damar anastomozu gerçekleştirilmeden önce gelişen iskemidir. Bu yüzden flep cerrahisinde ve replantasyon işlemlerinde, iskemi ve reperfüzyon hadisesi doğal bir durumdur. Sekonder iskemi ise operasyon sonrası komplikasyonlara veya flep pedikülünün yetersizliğine bağlı gelişen iskemidir. Komplikasyonlardan en önemlisi anastomoz problemleri ve trombozdur. Sıklıkla kötü cerrahi tekniğe bağlı olarak gelişir. Diğer nedenlere; hematom, alıcı damar yetersizliği, hiperkoagülopati ve ateroskleroz gibi faktörler örnek olarak gösterilebilir (3). Hem arteriyel hem de venöz iskemi flep başarısızlığına neden olur; ancak, venöz iskemi daha yaygındır ve daha fazla doku hasarına yol açar (57).

Uzamış iskemiye bağlı olarak hücrelerde adenozintrifosfat (ATP) üretimi azalır ve sodyum-potasyum pompaları fonksiyon gösteremez. Hücre içinde sodyum ve kalsiyum konsantrasyonu artar. Oksijen azlığına bağlı oksidatif fosforilizasyon duraksar. Artmış glikoliz reaksiyonuna bağlı olarak laktik asit artar; buna bağlı olarak da potansiyel Hidrojen (pH) değeri azalır. Asidoz gelişir. Uzamış iskemi, hücre tolerasyonunu aşarsa hücre nekrozu meydana gelir. Bu hadise iskemik nekroz olarak adlandırılır (4).

Anastomoz revizyonu sağlanır veya diğer faktörler giderilirse dokuda reperfüzyon gelişir. Asıl flep hasarları da uzamış sekonder iskemi sonrası sağlanan reperfüzyonla birlikte meydana gelir. İRH'nin temelinde uzamış iskemiye bağlı hücre içi enerjinin azalması ve reaktif oksijen türlerinin üretilmesi yer alır. Aynı zamanda,

İRH patogenezinde; ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz enzim sistemlerinin, nötrofilik nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADPH) ve miyeloperoksidaz (MPO) enzim sistemlerinin, azalmış NO seviyelerinin ve hücre içi artmış kalsiyum konsantrasyonunun önemli rolleri vardır (2).

Uzun süreli iskemide, deri ve kaslarda, ATP hipoksantine katabolize edilirken, aynı zamanda sitozolik kalsiyum seviyeleri artar (58). Bu süreçte, hücre içi kalsiyum tarafından aktive edilen bir sitozolik proteaz, ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüştürür . Reperfüzyon sırasında, ksantin oksidaz, hipoksantin varlığında moleküler oksijenin tek değerlikli redüksiyonu ile O2• oluşturur. Kararsız O2•, dismutasyon yoluyla hidrojen peroksite (H2O2) dönüşür (59). Ayrıca, kararsız O2•, H2O2 ile geçiş metali (örneğin demir) varlığında etkileşime girerek Haber–Weiss (Fenton) reaksiyonu yoluyla en güçlü sitotoksik hidroksil radikalini (OH•) oluşturur (Şekil 17).



Şekil 17. Ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz enzim sistemleri aracılıklı İRH yolağı (2)

İRH'de nötrofillerin de önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Özellikle solunumsal patlama sırasında, aktifleşmiş nötrofiller NADPH oksidaz aracılığıyla büyük miktarlarda O2 • üretilir ve O2 • dismutasyonu sonucu yüksek konsantrasyonda H2O2 ve OH• oluşur (60). Oluşan serbest radiller nedeniyle doku hasarı meydana

gelir. Nötrofillerde bol miktarda bulunan MPO, H2O2'nin hipokloröz aside (HOCl) dönüşümünü katalize eder, HOCl ise güçlü bir sitotoksik oksidan ajandır (61).

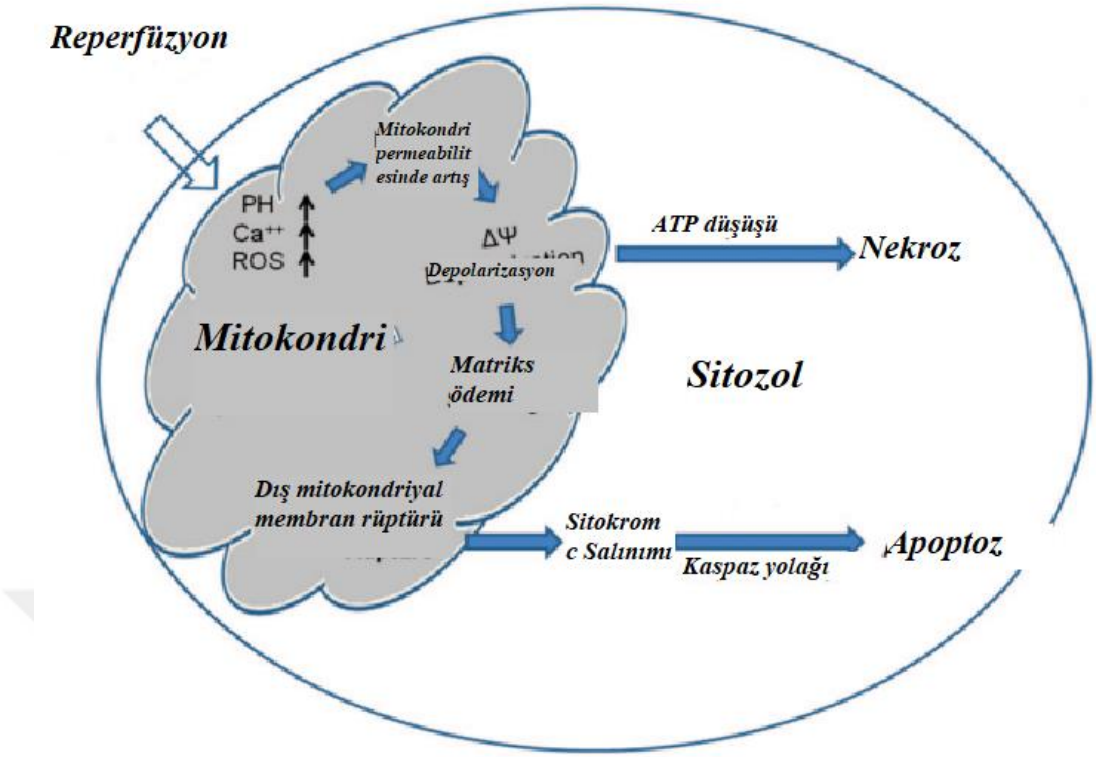
İlgili mekanizmalarla üretilen reaktif oksijen türleri, oksitleyici özellikleri sayesinde lipid peroksidasyonu oluşturur ve hücre zarlarına doğrudan zarar verir. Bunun sonucunda doku enflamasyonu artar. Nötrofillerin aktivasyonu gerçekleşir ve granülositler ile endotel hücreleri arasında adezyona yol açarak postkapiller venüllerde segmental damar tıkanıklıkları meydana gelir. Transendotelyal lökosit göçü artar ve böylece doku hasarı veren enzimlerin salınımı ile ikincil hasarlar oluşur (5).

İRH'deki bir diğer önemli mekanizma, NO eksikliğidir. L-arjinin, immün sistemi uyarıcı etkileri olan ve katabolik hastalarda yara iyileşmesini ve bağışıklık fonksiyonunu iyileştiren bir amino asittir. L-arjinin, NO'nun öncüsüdür (62). Endotel hücrelerinde ve nöronlarda L-arjinin, NO-sentaz (NOS) enzimi tarafından NO'ya dönüştürülür. NO'nun, İRH'de hem koruyucu hem de zararlı bir rol oynadığı düşünülmektedir. NO, vasküler tonusun düzenlenmesi, trombosit agregasyonunun ve adezyonunun inhibisyonu, lökositlerin endotele yapışmasının engellenmesi, serbest radikal nötralizasyonu, normal vasküler geçirgenliğin korunması, düz kas proliferasyonunun inhibisyonu, bağışıklık sisteminin güçlendirilmesi ve endotel hücre rejenerasyonunun uyarılması yoluyla dokuları İRH'den korur (63).

Ancak, NO aynı zamanda İRH'yi daha da kötüleştirebilir. NO'nun olumlu ve olumsuz etkileri, farklı nitrik oksit sentaz (NOS) izoformlarının ekspresyonundan kaynaklanabilir: yapısal (cNOS) ve indüklenebilir NOS (iNOS). iNOS enziminin İRH gelişimine katkıda bulunduğu düşünülmektedir. Bu enzim, oksijen radikalleri ile kimyasal olarak reaksiyona girerek peroksinitrit oluşturur. Peroksinitrit, yağın peroksidasyonuna neden olarak ve serbest radikal üretimini artırarak ek reperfüzyon hasarına yol açar. İskemi sırasında iNOS inhibisyonu, doku hasarını ve nekrozu önler (64). cNOS tarafından üretilen NO normalde trombositlerin ve nötrofillerin agregasyonunu ve adezyonunu inhibe ederek koruyucu etkiler gösterir. Ancak, iskemi başlangıcında, cNOS büyük miktarlarda NO üretir ve bu durum, öncüsü L-arjininin lokal olarak tükenmesine neden olur. Düşük L-arjinin konsantrasyonu sonucunda, endotel tarafından NO üretilemez ve bunun yerine serbest oksijen radikalleri üretilir. Bu radikaller, reperfüzyon sırasında üretilen serbest oksijen radikallerinin %70'ini oluşturabilir. NO konsantrasyonundaki azalma, vazokonstriksiyona, kapillerde nötrofillerin tıkanmasına ve mikrosirkülasyonda trombüs oluşumuna neden olur (65).

İRH’nin bir diğer hücre ölümüne neden olan mekanizması hücre içi kalsiyum (Ca2+) konsantrasyonu artışıdır (Şekil 18). Daha önceden bahsedildiği üzere, uzun süreli iskemi durumunda, mitokondriyal ATP sentezi durur ve glikoliz başlar. Bu durum, ATP'nin net olarak parçalanmasına ve laktat ile hücre içi hidrojenin (H+) birikmesine yol açar. Böylece, hücre içi asidoz gelişir. Hücre içi H+'ın birikmesi, Na+/H+ antiportörünü aktive eder. H+'ın hücre dışına atılması sağlanır ve hücre içi Na+'ın birikmesine neden olur. Enerjiye bağımlı Na+-K+-ATPaz pompasının inaktivasyonu nedeniyle Na+ atılımı sınırlı olduğu için, hücre içi Na+ birikimi daha da artar (66). Hücre içi Na+ konsantrasyonunun yükselmesi, Na+/Ca2+ antiportörünün aktivasyonu yoluyla hücre içi Ca2+ artışına neden olur. İskeminin devamı durumunda, sitozolik Ca2+ konsantrasyonu aşırı artar ve mitokondriye sitozolden önemli miktarda Ca2+ alımı gerçekleşir. Böylece mitokondriyal Ca2+ konsantrasyonu artar ve mitokondri depolarizasyonu gerçekleşir. Tüm bu hadiseler ATP sentezinin bozulmasına neden olarak hücre nekrozuna yol açar (67).

Reperfüzyon sırasında, hücre dışı H+'ın hızla uzaklaştırılması Na+/H+ antiportörünü yeniden aktive eder. İlgili antiportörün aktive olması hücre içi H+'ın daha fazla atılmasına ve hücre içi Na+'un daha fazla birikmesine neden olur. Bu durum, Na+/Ca2+ değişimi yoluyla sitozolik Ca2+ aşırı yüklenmesine yol açar. Benzer mekanizmayla, sitozolik Ca2+ konsantrasyon artışı, mitokondriyal Ca2+’nın aşırı yüklenmesine neden olur, ATP sentezi bozulur ve hücre nekrozu gerçekleşir. Mitokondriyal Ca2+ konsantrasyon artışı, hücrede sadece nekroz oluşturmaz. Aynı zamanda, mikondriyal permeabilite transizyon porlarının açılmasına neden olarak sitozole proapoptik bir madde olan sitokrom c kaçışı meydana gelir. Sitozolde meydana gelen sitokrom c artışı da, kaspaz bağlımlı mekanizmaları aktive ederek hücre apoptozuna neden olur (4).



Şekil 18. Hücre içi kalsiyum artışına bağımlı gelişen mekanizmalar (4)

2.3.4. ‘’No Reflow’’ Fenomeni

İRH, inflamatuar süreç ve reperfüzyonun erken evrelerinde reaktif oksijen türlerinin (ROS) artışı nedeniyle tüm flebin mikrodolaşımı üzerinde etkiye sahiptir. İRH nedenli azalmış mikrodolaşım genellikle flebin distal kısımlarında flep nekrozuna yol açar ve bu hadise parsiyel flep kaybının yaygın bir nedenidir. Bununla birlikte, kritik bir iskemi süresi sonrasında gelişen İRH durumunda, artmış intravasküler hemokonsantrasyona, endotel hücrelerinde ve intersisyal alanda ödem artışına, kapiller lümen daralmasına ve intravasküler agregasyona bağlı olarak total flep kaybına yol açan ‘’No Reflow’’ fenomeni gerçekleşebilir (5).

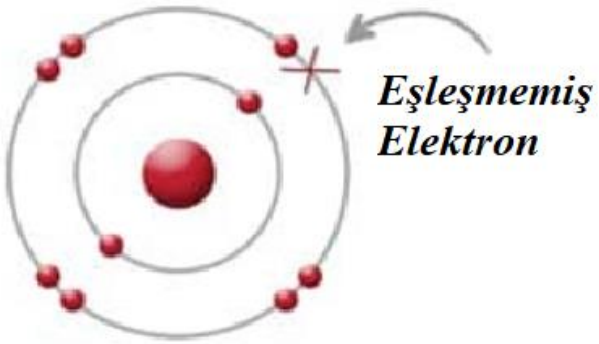
‘’No Reflow’’ fenomeninin gelişmesi için belirlenmiş kesin bir iskemi süresi belirtilmemiştir. Fenomenin patogenezini incelemek için literatürde hayvan deneyi çalışmaları bulunmaktadır. Bu patolojik hadisenin, iskemi süresinin 1 saatten 8 saate kadar uzamasıyla arttığı, 12 saatlik iskemiden sonra geri döndürülemez bir noktaya ulaşarak ‘’No Reflow’’ fenomeninin gerçekleştiği ve nihai flep kaybına neden olduğu saptanmıştır (2). Bu fenomenin gelişiminde rol oynayan üç ana patojenik mekanizma belirlenmiştir: Bunlardan ilki; oksijen türevi serbest radikallerin endotel ve parankimal hücrelerde hasara yol açmasıdır. Diğeri; hücre membranı hasarının Ca2+

girişine izin vermesi ve bunun sonucunda hücre içi aşırı Ca2+ konsantrasyon artışının meydana gelmesidir. Sonuncusu ise; araşidonik asit metabolizmasındaki değişikliklerin, endotel tarafından vazodilatör ve antitrombotik özellik gösteren PGI2'nin daha az salınması ve trombositler tarafından vazokonstriktör ve trombotik özellik gösteren tromboksanın daha fazla sentezi ile sonuçlanmasıdır (68).

2.4. Serbest Radikaller

Serbest radikaller, 50 yıldan daha kısa bir süre önce keşfedilmiştir. İlk olarak tamamen zararlı olarak kabul edilmiştir, ancak sonrasında serbest radikallerin fizyolojik etkileri de rapor edilmiştir. Günümüzde; serbest radikallerin rolü, hem fizyolojik koşullarda hem de hastalıklarda yaygın olarak araştırılmaktadır (69).

Moleküler biyolojide, dış valans orbitalinde eşlenmemiş bir elektrona sahip olan ve stabiliteyi yeniden sağlamak için ekstra bir elektrona ihtiyaç duyan moleküller serbest radikal olarak adlandırılır (Şekil 19). Serbest radikaller kısa ömürlü ve son derece reaktiftir. Hücre fizyolojisinde, düşük seviyelerdeki serbest radikaller otofaji, hücre sinyalizasyonu ve antimikrobiyal oksidatif patlamalar gibi süreçlerde kullanılır (70). Sağlıklı bir organizmada serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma sistemleri arasında bir denge vardır. Bu dengenin serbest radikal üretiminin artması veya antioksidan savunma sistemlerinin zayıflaması nedeniyle okside edici ajanlar lehine bozulması durumunda, oksidatif stres denilen durum ortaya çıkar. Oksidatif stres halinde, yüksek seviyelerde bulunan serbest radikaller, komşu moleküllerle (lipidler, proteinler ve DNA) etkileşime girerek hasara neden olur. Oksidasyona uğrayan molekül, başka bir molekülden elektron çalmak için bir zincir reaksiyon oluşturur. Bu nedenle aerobik organizmalarda, serbest radikaller, canlı hücreye zarar veren otokatalitik reaksiyonları başlatır (5). Lipit hasarı durumunda, özellikle membranlarda bulunan çoklu doymamış yağ asitlerinin peroksidasyonu sonrası oluşan malondialdehit (MDA) seviyeleri yükselir(71). Protein hasarı durumunda ise, albumin, fibronejen ve lipoproteinlerin okside formları olan ve ‘’ileri oksidasyon protein ürünleri’’ (AOPP) olarak adlandırılan maddelerin düzeyleri artar (72). İlgili maddeler, oksidatif stresin belirteçleri olarak araştırmalarda yer almaktadır.



Şekil 19. Serbest radikal illustrasyonu

Reaktif oksijen türleri (ROS), endojen veya eksojen kaynaklardan üretilebilir. Endojen ROS, oksijen tüketiminin yüksek olduğu mitokondri, peroksizom ve endoplazmik retikulum gibi organellerde üretilir. ROS'lara O2- ve ·OH örnek olarak verilebilir. O2- bir oksijen molekülüne ekstra bir elektron eklenerek oluşabilir. ·OH iki farklı şekilde oluşabilir: İlk olarak, O2- ve H2O2'den metal (örneğin demir) tarafından katalize edilen bir reaksiyonla oluşabilir.İkinci yol ise, singlet oksijen reaksiyonundan oluşmasıdır (5). ROS miktarı birçok faktöre bağlıdır. Hipoksi dönemlerinde, mitokondriyal enerji sentezinde fazla elektron üretimi serbest radikallerin gelişmesine neden olabilir ve bu radikaller daha önce bahsedildiği üzere lipidlere ve proteinlere zarar verir. Bu durum, enerji sentezi sırasında mitokondri için oksijen kullanılabilirliğini daha da azaltır. Ayrıca, ROS, iskemik dokudaki polimorfonükleer lökositler tarafından da üretilebilir (73).

Hücredeki diğer önemli serbest radikal türü reaktif azot türleridir (RNS). NO radikali, NOS enzimi tarafından oluşturulur ve düz kas gevşemesi ile çeşitli siklik guanozin monofosfat (cGMP) bağımlı işlevlerde rol alır (74).

Serbest radikaller, kanser, diyabet, kardiyovasküler hastalıklar, nörodejeneratif hastalıklar, katarakt, astım, romatoid artrit, inflamasyon, yanıklar, bağırsak hastalıkları, progeryalar ve iskemik ile postiskemik patolojiler gibi birçok patolojik durumda önemlidir. Ayrıca, yaşlanmanın serbest radikaller tarafından aracılık edilen bir süreç olduğuna inanılmaktadır. Günümüzde, hücre hasarını önlemek ve serbest radikalleri anlamak amacıyla her kimyasal adım araştırılmaktadır (5).

2.5. İnsan Vücudunun Serbest Radikallere Karşı Savunma Mekanizmaları

Daha önceden bahsedildiği üzere, serbest radikallerin birikimi hücre canlılığına zarar verir, ancak insan vücudu ROS'un etkilerini azaltabilen çeşitli antioksidan enzimlere sahiptir. Bu enzimler arasında süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz, glutatyon redüktaz ve katalaz bulunmaktadır (5).

Süperoksit dismutaz (SOD), O_2^-'yi oksijen (O_2) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) moleküllerine dönüştüren dismutasyon reaksiyonunu katalize eder. Katalaz, bir hem içeren enzim olarak, H_2O_2'yi su ve oksijene dönüştürür. H_2O_2 ayrıca selenyum bağımlı bir enzim olan glutatyon peroksidaz (GSH-P) tarafından indirgenir, bu da indirgenmiş glutatyonu okside glutatyon haline dönüştürür. Bu reaksiyondan sonra, okside glutatyon, NADPH yardımıyla yeniden indirgenmiş forma dönüştürülür. NADPH, glukoz 6-fosfat dehidrogenaz enzimi tarafından katalize edilen glukoz 6-fosfattan yeniden oluşturulur (75).

Glutatyonun (GSH) biyokimyasal reaksiyonları oldukça önemlidir. GSH'nin serbest radikallerle tepkimesi sonrası son ürün olarak glutatyon disülfid oluşur. Glutatyon disülfid, hücrelerden atılabilir veya glutatyon redüktaz ve NADPH kofaktörünün birleşik etkisiyle yeniden GSH haline dönüştürülebilir. GSH, tiol grubu aracılığıyla doğrudan ROS ve RNS ile reaksiyona girebilir; ayrıca serbest radikallerin etkisiyle proteinlerin içinde ve arasında oluşan disülfid köprülerini hedef alabilir (5).

Tablo 1. İnsan Vücudunun Antioksidan Enzimleri

Süperoksit dismutaz	$2O_2^- + 2H \rightarrow O_2 + H_2O_2$
Katalaz	$2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$
Glutatyon peroksidaz	$2GSH + H_2O_2 \rightarrow GSSG + H_2O$
Glutatyon redüktaz	$GSSH + NADPH + H^+ \rightarrow 2GSH + NADP^+$
Glukoz 6-fosfat dehidrogenaz	Glukoz 6-P + $NADP^+ \rightarrow$ glukonat 6-P + NADPH + H^+

2.6. Flep Canlılığını Arttırmaya Yönelik Cerrahi ve Farmakolojik Manipülasyonlar

2.6.1. Giriş

Flep canlılığını arttırma amaçlı günümüze dek birçok klinik ve deneysel çalışma yapılmıştır. Bu çalışmalardaki ana amaç, flepleri İRH'den korumak ve iskemiye karşı dayanıklılığı arttırıcı yöntemler bulmaktır. Cerrahi ve vasküler geciktirme, koşullandırma yöntemleri, farmakolojik tedaviler ve kök hücre tedavileri flepleri İRH'den koruyarak canlılığını arttırmaya yönelik kullanılan manipülasyonların çoğunluğunu oluşturur (2).

2.6.2. Cerrahi ve Vasküler Geciktirme

Cerrahi geciktirme ve vasküler geciktirme, insanlarda(76) ve deney hayvanlarında (77) flep canlılığını arttırmada etkinliği kanıtlanmış yöntemlerdir. Cerrahi geciktirme, deri fleplerinin canlılığını artırmak için iki ila üç aşamadan oluşur. İlk aşamada, nihai rekonstrüksiyonda kullanılması planlanan deri flebi iki longitüdinal kenarından insize edilir. Daha sonra, bu flep tabanından kaldırılarak bipediküllü bir flep oluşturulur ve tekrar donör bölgesine sütüre edilir. İki ila üç hafta sonra, flebin distal ucu bir veya iki aşamada kesilir. Bu sürecin sonunda, tek pediküllü flep tamamen kaldırılır ve alıcı bölgeye taşınarak nekroz oluşmadan yara kapaması sağlanır (78).

Domuz random-patern deri flepleri üzerinde yapılan çalışmalar, cerrahi geciktirmenin kapiller kan akımını artırdığını göstermiştir. Cerrahi geciktirme uygulandıktan sonra, deri fleplerinde 2 ila 7 gün arasında kapiller kan akımında belirgin bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, özellikle geciktirilmiş deri fleplerinin distal kısımlarında yoğunlaşmıştır (79).

Vasküler geciktirmede ise, pediküllü bir flebin nihai transferi sırasında kullanılacak pedikülü dışında kalan diğer dominant veya segmental pediküllerinin ligasyonu sağlanır. Bu işlem flep transferinden 2 ila 4 hafta öncesinde gerçekleştirilir. Böylece kullanılacak pedikülün flepte perfüze ettiği alanın arttırılması ve distal bölgede nekroz olasılığı azaltılmaya çalışılır. İnsanlarda vasküler geciktirmenin sık kullanıldığı fleplerden bir tanesi transvers rektus abdominis myokutanöz (TRAM) flebidir. Yapılan klinik çalışmalarda, flep cerrahisinden 2-4 hafta önce derin inferior

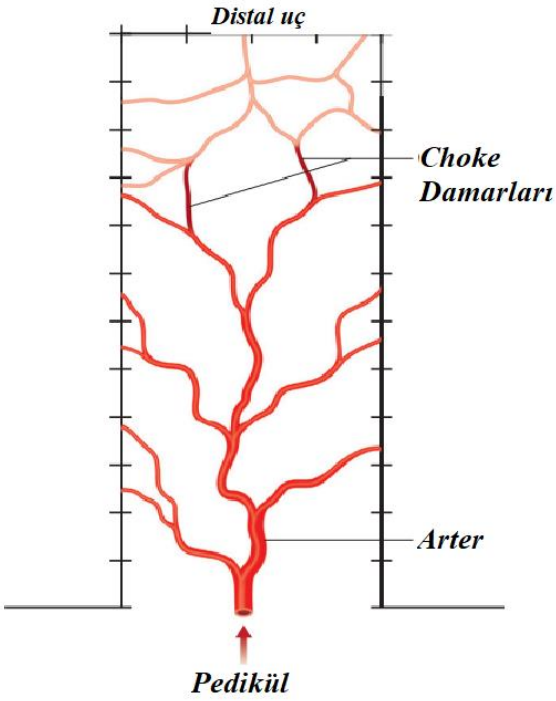
epigastrik arterlerin ligasyonu, TRAM fleplerinde deri kan akışını ve canlılığını artırmıştır (80). Vasküler geciktirme yönteminin etkinliği deney hayvanlarında da gösterilmiştir. Fareler, sıçanlar ve tavşanlarda, latissimus dorsi kas fleplerinin distal kısmında kan akımını ve canlılığı artırmak için vasküler geciktirme yöntemi kullanılmıştır. İlgili çalışmalarda vasküler geciktirme, kas fleplerinin kaldırılmasından 1-2 hafta önce distal perforan arterlerin ligasyonuyla sağlanmıştır (81).

Hem cerrahi hem de vasküler geciktirme teknikleri, flep canlılığını artırmada klinik olarak etkili olsa da, maliyetli ve zaman alıcıdır. Genel anestezi altında en az bir ek cerrahi işlem gerektirirler. Alternatif bir yaklaşım olarak embolizasyon ile vasküler geciktirme, genel anestezi gerektirmez. Ancak lokal anestezi altında ve girişimsel radyoloji eşliğinde kateterizasyon gerektirir (82).

Birçok araştırmacı, fleplerdeki iskemik nekrozun patogenezini ve tedavi seçeneklerini anlamak amacıyla deney hayvanlarında cerrahi geciktirme fenomenini incelemiştir. Bu çalışmalar sonucunda çeşitli hipotezler ortaya atılmıştır. Reinisch, cerrahi gecikme uygulanan bipediküllü deri fleplerinde sempatik denervasyonun erken döneminde arteriovenöz (AV) şantların açıldığını ve böylece fleplere yeterli kan akımı sağlandığını ileri sürmüştür (83). Pearl de, Reinisch'in hipotezini destekleyen ve cerrahi geciktirmenin deri fleplerinin hiperadrenerjik durumundan kurtulmasını sağladığını öne süren veriler sunmuştur (84).

Cerrahi geciktirmenin olumlu sonuçlar göstermesi ile ilgili bir diğer hipotez vazokonstriktör ve protrombotik maddelerin azalmasıdır. Daha önceden bahsedildiği gibi bir deri flebi kaldırıldığında, lokal doku içeriğinde NE, TXA2, 5HT2 ve ET-1 gibi vazokonstriktör ve protrombotik maddelerin artışı meydana gelir (85). Bu maddeler, hasara uğramış kan hücreleri, endotelyal hücreler ve sempatik sinir uçları tarafından lokal olarak salınmaktadır. Bu maddeler, flep damarlarında güçlü vazokonstriktör etkilere sahiptir. Vazospazm ve trombozun deri fleplerinde iskemik nekroz patogenezinde önemli bir rol oynadığı bilinmektedir. Cerrahi geciktirme prosedürünün bu maddelerin lokal üretimini azalttığı ve cerrahi geciktirme sonrası oluşan bipediküllü fleplerin tek pediküllü fleplere dönüştürülmeden önce vazokonstriktör ve protrombotik maddelerin tükenmesi için zaman tanıdığı konusunda genel bir görüş birliği vardır (86).

Hipotezlerden bir diğeri ise, cerrahi geciktirme sonrasında flep içerisindeki choke damarlarının açılmasıdır. Bu sayede flebin pedikülünün sahip olduğu anjiyozom genişlemektedir. Pang ve arkadaşları, geciktirilmiş random patern domuz deri fleplerinde kapiller kan akışını incelemiştir. Çalışmalarında, deri fleplerinde kapiller kan akımının, geciktirmenin ilk 2 gününde, önemli ölçüde arttığını, kapiller kan akımındaki maksimum artışın 2-3 gün arasında gerçekleştiğini ve 4-14 gün arasında değişmeden kaldığını bulmuşlardır. Bu artışın arteriyogenez ile ilişkisiz olduğu saptanmıştır. Kapiller kan akımındaki bu artışın çoğunlukla deri flebinin distal kısmında meydana geldiği gözlemlenmiştir (87). Benzer bir kapiller kan akımı artışı, domuz TRAM fleplerinde 3-4 günlük geciktirmede de gözlemlenmiştir. Bu kısa süre içinde arteriyogenez olasılığının düşük olduğu belirtilmiştir (88). Bu nedenle, araştırmacılar bu fenomeni, choke damarlarının açılması yoluyla anjiozomların genişlemesi olarak tanımlamışlardır (Şekil 20).



Şekil 20. Cerrahi geciktirme sonrası choke damarlarının açılması (2)

Bu konu hakkındaki son hipotez ise, ilgili prosedür sonrası artan anjiogenezdir. Vasküler geciktirmenin bu koruyucu etkisi, vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve temel fibroblast büyüme faktörü (FGF) gen ekspresyonunda belirgin bir artış sağlaması ile ilişkilendirilmiştir. Lineaweaver ve arkadaşları, sıçan TRAM fleplerinde vasküler geciktirmenin cilt adası canlılığını artırdığını bildirmişlerdir.

Araştırmacılar, artmış VEGF ve FGF gen ekspresyonlarının sonucunda vazodilatasyon ve anjiyogenezin indüklediğini öne sürmüşlerdir (89).

2.6.3. Koşullandırma Yöntemleri

Son yıllarda literatürde tartışılan en popüler manipülasyon yöntemlerinden biri koşullandırmadır. Bu yöntem, çeşitli organlarda ve dokularda reperfüzyon hasarını iyileştirmek için güçlü bir deneysel yöntem olarak ortaya çıkmaktadır. Literatürde dört tür koşullandırma yöntemi tanımlanmıştır: İskemik ön koşullandırma, iskemik sonradan koşullandırma, uzak iskemik ön koşullandırma ve uzak iskemik sonradan koşullandırma (4).

İskemik ön koşullandırma, bir flebin uzun süreli iskemiye uğramadan önce kısa süreli iskemi ve reperfüzyon süreçlerine sokulması ile tanımlanır. İRH'ye karşı mekanizmaları tetikleyerek dokuları sürekli İRH'ye karşı korur. Huang ve arkadaşları, iskemik ön koşullandırmanın sıçan kremaster kasında 4 saat iskemi ve ardından 2 saat reperfüzyon sonrasında kapiller yoğunluğu artırdığını ve lökositlerin yuvarlanmasını, adezyonunu ve transmigrasyonunu önlediğini bildirmişlerdir. Ayrıca, iskemik ön koşullandırmanın, nitrik oksit sentaz izoformlarının üretimini arttırdığı saptanmıştır (90). Schoen ve arkadaşları, sıçan arka bacak modelinde 3 saat iskemi ve ardından 24 saat reperfüzyon sonrasında iskemik ön koşullandırmanın, bacak perfüzyonunu iyileştirdiğini, lökosit-endotelyal hücre etkileşimini ve hücre apoptozunu azalttığını bulmuşlardır (91). Ek olarak, Tatlıdede ve arkadaşları, iskemik ön koşullandırmanın fare dorsal lateral torasik arter aksiyel deri flep modelinde İRH kaynaklı nekroza karşı önemli bir koruma sağladığını göstermişlerdir (92).

Uzak iskemik ön koşullandırma, bir flebin uzun süreli iskemiye uğramadan önce başka bir organ veya dokuda kısa süreli iskemi ve reperfüzyon süreçleri ile karakterizedir. Uzak bölgelerdeki dokuların veya organların daha sonra gelen sürekli iskemi hasarına karşı korunmasını sağlar. Eberlin ve arkadaşları, uzak iskemik ön koşullandırmanın İRH'ye karşı hem lokal hem de uzak bölgelerde koruma sağladığını ve fare arka bacak modelinde önemli ölçüde mortalite azalmasını sağladığını bildirmişlerdir (93).

İRH'yi azaltmak için bahsedilen ön koşullandırma konseptleri uygulanabilir. Elektif serbest doku transferi veya kompozit doku allotransplantasyonu gibi iskeminin cerrah tarafından kontrol edilebildiği durumlarda, iskemik ön koşullandırma veya uzak

iskemik ön koşullandırma kullanılabilir. Örneğin, serbest flep kaldırıldıktan sonra, pedikül ligasyonu öncesi, pedikül üzerinde kısa süreli oklüzyon aralıklarından oluşan bir iskemik ön koşullandırma manevrası veya operasyona dahil olmayan bir ekstremitede kısa süreli iskemi ve reperfüzyon aralıklarından oluşan bir uzak iskemik ön koşullandırma manipülasyonu mümkündür (4).

Sonradan koşullandırma ise bir flebin reperfüzyonu başlangıcında kısa süreli iskemi ve reperfüzyon (İR) süreçleri ile tanımlanır ve İRH'yi azaltarak koruma sağlar. McAllister ve arkadaşları, domuz latissimus dorsi kas fleplerinde 4 saatlik iskemi ve 48 saatlik reperfüzyondan sonra sonradan koşullandırmanın etkisini incelemiştir ve sonradan koşullandırmanın kas nekrozunu önemli ölçüde azalttığını saptamışlardır (94).

Benzer şekilde, uzak sonradan koşullandırma da bir flebin reperfüzyonu başlangıcında başka bir organ veya dokuda kısa süreli iskemi ve reperfüzyon aralıkları ile karakterizedir. Uzak bölgelerdeki organların veya dokuların reperfüzyon hasarına karşı korunmasını sağlar. Tsubota ve arkadaşları, fare arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde uzak sonradan koşullandırmanın etkilerini incelemişlerdir. Sol arka bacakta uygulanan uzak sonradan koşullandırmanın, sağ arka bacakta iskemi-reperfüzyon kaynaklı kas hasarını önemli ölçüde azalttığını bildirmişlerdir (95).

Devaskülarize veya ampute geçirmiş ekstremitelerin kurtarılması durumunda, iskemi zaten gerçekleşmiş ve ön koşullandırma için uygun zaman penceresi kapanmıştır. Bu durumlarda, sonradan veya uzak sonradan koşullandırma manipülasyonları uygulanabilir. Reperfüzyon hasarı kan akımı tekrardan sağlandığında dakikalar içinde başladığından, sonradan koşullandırma veya uzak sonradan koşullandırma manevraları reperfüzyonun başlangıcında uygulanmalıdır (4).

2.6.4. Kök Hücre Tedavileri

Kemik iliği kökenli ve adipöz doku kökenli kök hücrelerin tedavisinin, İRH'yi azaltma açısından potansiyelleri bulunduğu literatürde gösterilmiştir. İlgili kök hücreler, damar proliferasyonunu sağlayan endotelyal hücrelere farklılaşma yeteneğine sahiptir ve bu sayede iskemik ortamda doku viabilitesini arttırabilir (96). Aynı zamanda sitoprotektif sitokinler ve pro-anjiyojenik faktör sinyallemesinde de rol oynarlar (97). Örneğin, Reichenberger ve arkadaşları, adipöz doku kökenli kök hücrelerin (ADSC) hücre içi tümör nekroz faktörü-alfa (TNF-alfa) ekspresyonunu

azaltabileceğini, bu sayede programlanmış hücre ölümünü önleyip hücre sağ kalımını arttırabileceğini öne sürmüşlerdir (98). Uysal ve arkadaşları, 2009 yılında, random patern deri fleplerine 6 saatlik iskemi öncesi ADSC enjeksiyonu uygulamışlardır. Vasküler konsantrasyonda, endotelyal hücre sayısında ve flep viabilitesinde kontrol gruplarına kıyasla istatistiksel olarak anlamlı artışlar gözlemlenmiştir. Gözlemlenen iyileşmelerin sadece artmış anjiyogenez ve anti-enflamatuar etkilerden değil, aynı zamanda ADSC'lerin migrasyon, farklılaşma ve proliferasyonunu indükleyen kemotaktik faktörlerin üretiminin artmasından kaynaklandığı öne sürülmüştür (99).

ADSC'leri içeren yağ dokusu, minimal donör alan morbiditesi ile minimal invaziv yöntemlerle büyük miktarlarda elde edilebilir (100). Ayrıca literatürde, ADSC'lerin kemik iliği kaynaklı kök hücreler ile benzer seviyede potense ve proliferatif etkinliğe sahip olduğu söylenmiştir. Günümüzde flep cerrahisi alanında kök hücre tedavilerine ait veriler kısıtlıdır. Ancak gelecekte, kök hücre tedavilerinin, İRH'yi önleme stratejileri arasında kişiselleştirilmiş tedaviler arasında yer alması beklenilmektedir (101).

2.6.5. Farmakolojik Tedaviler

Daha önce bahsedildiği üzere, cerrahi geciktirme ve koşullandırma prosedürleri maliyetli veya zaman alıcıdır. Bu nedenle, flep cerrahisinde İRH'yi azaltmak ve viabiliteyi arttırmak için ,henüz klinik olarak kabul görmemiş olsa da, farmakolojik tedaviye yönelik birçok araştırma yapılmıştır. Genellikle farmakolojik tedavinin temeli, ROS ve diğer inflamatuar modülatörlerin üretimini önlemek veya etkilerini azaltmak, hücre korumasını veya yeni damar oluşumunu sağlayan sinyal yollarını indüklemek üzerine kurulmuştur. Antioksidanlar, NO donörleri ve türleri, statinler, anti-lökosit terapileri ve gen terapileri farmakolojik tedaviye ait çalışmaların çoğunluğunu oluşturmaktadır(5). Farmakolojk ajanlar iskemi öncesi, sonrası veya sırasında kullanılabilmektedir (101).

NO seviyelerinin azalması İRH'nin temelinde yatan nedenlerden bir tanesidir. NO donörlerinin takviyesi, çeşitli İRH modellerinde incelenmiş ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Mittermayr ve arkadaşları, bir NO donörü olan S-Nitrisso uygulaması ile sıçan epigastrik ada flebi İRH modelinde 7. gün sonunda flep viabilitesinde anlamlı artış saptamışlardır (20). Ayrıca, Ward ve arkadaşları, nitrik oksit sentaz

inhibitörlerinin soğuk (10°C) iskemik iskelet kasında bile iskemi-reperfüzyon kaynaklı mikrovasküler geçirgenliğini önemli ölçüde arttırdığını bildirmişlerdir (102).

Nitrit, dolaşımda mikromolar seviyelerde bulunan biyolojik olarak aktif bir NO türüdür. Son zamanlarda, nitritin kan içinde fizyolojik olarak önemli bir nitrik oksit rezervi olduğu keşfedilmiştir. Nitrit, hipoksik ve asidik koşullar altında enzimatik ve enzimatik olmayan mekanizmalarla nitrik oksite kolayca dönüştürülebilir. İskemi sırasında mevcut olan hipoksik ve asidik koşullar, nitrit biyokonversiyonunu kolaylaştırmak için optimal bir ortam oluşturur. İskemi sırasında dışarıdan nitrit verilerek NO takviyesi yapılması kalp ve karaciğerde rapor edilmiştir. Wang ve arkadaşları ise, iskemik kasın dolaşımına intraarteriyel infüzyon yoluyla doğrudan düşük doz sodyum nitrit verilmesinin, kas flebinin reperfüzyon kaynaklı değişikliklerini ve mitokondriyal disfonksiyonları önemli ölçüde azalttığını bildirmiştir (103).

Son zamanlarda, kolesterol düşürücü ajanlar olarak bilinen statinler, birçok farklı organda İRH üzerinde terapötik etki göstermiştir. Dillon ve arkadaşları, pravastatin ile ön tedavinin, rat iskelet kasında İRH ile ilişkili doku oksidatif hasarını ve ödemi azalttığını bildirmiştir (104). Benzer şekilde, Cowled ve arkadaşları, simvastatinin rat iskelet kasında İRH kaynaklı nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir (105).

İRH'yi önlemeye yönelik çalışmalar arasında lökositler tarafından salınan inflamatuar mediyatörleri engellemeyi amaçlayan araştırmalar da bulunmaktadır. Anti-lökosit tedavisi, inflamatuar mediyatör salınımının veya reseptör etkileşiminin inhibisyonuna, lökosit adezyon molekülü sentezine veya lökosit-endotel adhezyonuna odaklanmıştır. Birçok farmakolojik ajanın İRH'ye karşı oldukça etkili olduğu kanıtlanmıştır (5). Örneğin Gideroğlu ve arkadaşları, bir lökotrien reseptör antagonisti olan montelukast sodyum uygulaması sonrası sıçan epigastrik ada flebi iskemi-reperfüzyon modelinde nekroz oranlarında anlamlı düşüş saptamışlardır (16).

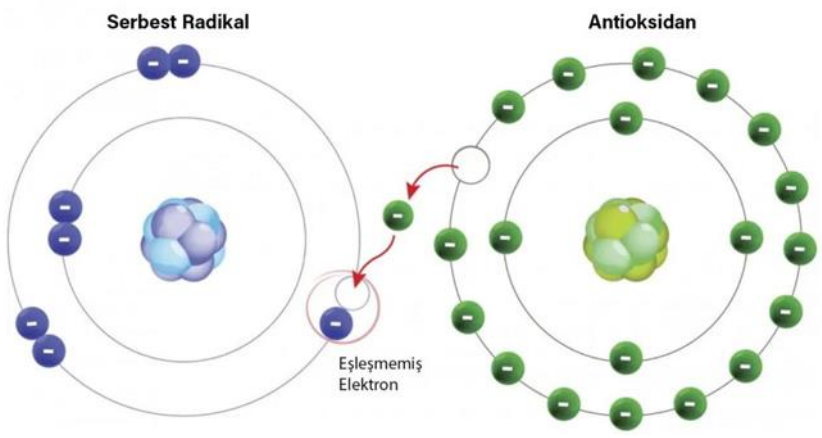
VEGF, FGF ve platelet derive büyüme faktörü (PDGF) gibi büyüme faktörleri kapiller damar yoğunluğunu artırarak anjiyogenezi arttırır. Son zamanlarda, flep canlılığını artırmak için ilgili büyüme faktörlerinin rekombinant formlarının kullanımına odaklanılmıştır. Örneğin, sıçan dorsal random patern deri flepleri kaldırıldıktan hemen sonra VEGF165'in lokal olarak subdermal enjeksiyonu ile

azalmış nekroz oranları saptanmıştır (106). Benzer şekilde, sıçan epigastrik ada flebi modelinde VEGF165'in lokal intraarteriyal enjeksiyonu (107) ve TRAM flebi modelinde 20 gün önce rektus abdominis kasına VEGF165 enjeksiyonu (108) ile de artmış iyileşme yüzdeleri sağlanmıştır. FGF'nin de deri flep canlılığını artırabileceğine dair kanıtlar mevcuttur. Sıçan dorsal random patern deri fleplerinde cerrahiden 30 dakika önce FGF'nin intradermal enjeksiyonun flep canlılığını anlamlı şekilde arttırdığı bulunmuştur (109). Ayrıca, PDGF tedavisinin, latissimus dorsi kasının canlılığını artırmada cerrahi geciktirme fenomenini taklit ettiği bildirilmiştir (110).

2.7. Antioksidanlar

2.7.1. Antioksidanların Genel Özellikleri

Antioksidanlar, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücreleri koruyan moleküllerdir. Vücudu serbest radikal hasarına karşı koruyan çok sayıda antioksidan sistemi bulunmaktadır. Bu sistemler, enzimatik ve enzimatik olmayan antioksidanlardan oluşur. SOD, GSH-P ve katalaz gibi enzimler, enzimatik antioksidanlara örnek olarak verilebilir. Enzimatik antioksidan sistemleri de kendi aralarında zincir kırıcı ve önleyici sistemler olarak ayrışır. Zincir kırıcı enzimler, ROS'u indirgenmesine yol açıp oksidan zincir tepkimelerinin oluşumunu engeller. Önleyici enzimler ise ROS üretimini azaltıcı durumları katalizler ve antioksidan özelliklerini bu şekilde gösterir. Vitamin E (α-tokoferol), β-karoten, vitamin C (askorbik asit) ve glutatyon ise nonenzimatik antioksidanlara örnek olarak verilebilir (5). Bu antioksidanlar serbest radikalleri indirger ve böylece reaktivitelerini sonlandırır (Şekil 21).



Şekil 21. Serbest radikalin antioksidan madde tarafından indirgenmesi (111)

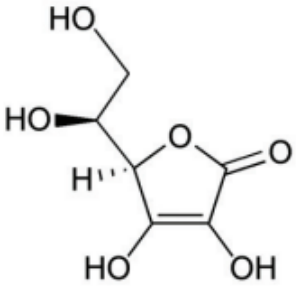
Antioksidanlar, endojen (vücut tarafından üretilen) veya ekzojen (diyet veya takviyeler yoluyla alınan) olabilirler. Oksidatif stres durumunda, endojen antioksidanlar yeterli olmayabilir ve hücresel fonksiyonları optimal seviyede sürdürmek için diyetle alınan antioksidanlara ihtiyaç duyulabilir. Literatürde, ekzojen antioksidanların ROS'a karşı ikincil savunma sistemi oluşturduğu belirtilmektedir. Flep cerrahisinde de İRH durumunda oluşan aşırı ROS üretimi, mevcut antioksidan savunma sisteminin kapasitesini aşabilir, bu nedenle ikincil savunma sisteminin katkısı hayati önem taşır (112).

Yukarda bahsedilen sebeplerden dolayı, günümüze dek, deney hayvanı İRH modellerinde çok sayıda antioksidan maddenin etkinliği araştırılmıştır. Literatürde, Vitamin C(6,7), Vitamin E(8), Melatonin(9), Fucoidin(10), Koenzim Q10(11), Kafeik asit fenilester(12), taurine(13), ekstrasellüler süperoksit dismutaz(14), çinko(15), D-allose(18), Sulfatid(19), , üzüm çekirdeği ekstresi(21), Likopen(6), Proxeed plus (22) gibi maddeler nekroz oranlarını azaltma, mikrodolaşım değişikliklerini azaltma, süperoksit radikalinin üretimini sınırlama, mitokondriyal disfonksiyonu önleme, metabolik disfonksiyonu azaltma, histolojik hasarı azaltma, miyeloperoksidaz aktivitesini ve plazma kreatin fosfokinaz aktivitelerini düşürme gibi olumlu sonuçlar göstermiştir. Ancak flep çalışmalarında tek bir antioksidan veya antioksidan kombinasyonu içeren, örneklem sayısı büyük, randomize, çok merkezli klinik bir çalışma bulunmamaktadır (4). Aynı zamanda, antioksidan tedavilerin başlangıç zamanlamalarının karşılaştırıldığı bir yayın bulunmamaktadır (2).

2.7.2. Vitamin C

C vitamini (askorbik asit), çoğu memeli türünün karaciğerinde glikozdan sentezlenen altı karbonlu bir laktondur (Şekil 22). Ancak, insanlar, insan olmayan primatlar ve kobaylar bu enzime sahip değildir. Bu türler, askorbik asidin doğrudan öncüsü olan 2-keto-l-gulonolaktonun sentezi için gerekli olan gulonolakton oksidaz enzimine sahip değildir. İnsanlar diyetlerinde C vitamini almadıklarında, geniş bir klinik belirti yelpazesi ile karakterize edilen bir eksiklik durumu ortaya çıkar. C vitamini eksikliğinin klinik ifadesi olan skorbüt, uygun şekilde tedavi edilmezse ölümcül bir durumdur. Bu nedenle, insanların hayatta kalabilmesi için eksojen yollarla C vitamini alması zorunludur (113). Bitkisel kökenli hemen hemen tüm gıdalarda C Vitamini bulunur. İnsanlar için günlük minimum C vitamini gereksinimi, diyetle ilgili eksiklikleri önlemek için 40-60 mg olarak tanımlanmıştır. Ancak, yaş ve sigara içme

ile C vitamini seviyeleri azalır ve bu durum romatoid artrit ve kanser gibi kronik hastalıklarla ilişkili bulunmuştur (114).



Şekil 22. Vitamin C'nin moleküler yapısı (114)

C vitamini, çeşitli biyolojik işlevler için gerekli olan suda çözünen bir moleküldür ve normal büyüme ile gelişme için kritik öneme sahiptir. Kollajen sentezinde post-translasyonel hidroksilasyon, karnitin biyosentezi, dopaminin norepinefrine dönüşümü, peptid amidasyonu ve tirozin metabolizmasında birçok enzimin esansiyel bir kofaktörüdür. Ayrıca; serbest radikallere karşı koruma ve demir emilimini artırmada rol oynayan güçlü bir antioksidandır (114).

C vitamini, biyolojik sistemlerde en güçlü indirgeme ajanlarından biri olup, serbest radikalleri ve hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve tekil oksijen gibi ROS'ları nötralize eden bir serbest radikal süpürücüsüdür. Altı karbonlu molekülündeki ikinci ve üçüncü karbonlar arasındaki çift bağdan iki elektron transferi sağlama kapasitesine sahiptir (113). Elektron transferi ile indirgeme sağlama ve nispeten kararlı bir askorbil serbest radikali oluşturma yeteneği ile bu etkisini gösterir. Bu antioksidan aktivitesi sayesinde C vitamini, serbest radikallerin proteinlerde ve lipit membranlarda neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korur ve biyolojik sistemlerde önemli bir rol oynar (115).

Ayrıca, C vitamini, güçlü bir non enzimatik antioksidan olmasının yanı sıra, tokoferoksil radikallerini azaltarak vitamin E'nin antioksidan formunu yeniden oluşturmakta da etkilidir. Bu süreç, serbest radikallerin neden olduğu hasardan hücre zarlarını ve hücrenin diğer bölümlerini korumaya ekstra yardımcı olur (116).

Askorbik radikal, eşleşmemiş elektronu ile uzun ömürlü bir bileşik değildir. İkinci bir elektronu kaybettiğinde, oluşan bileşik dehidroaskorbik asittir. Dehidroaskorbik asidin kararlılığı sıcaklık ve pH gibi faktörlere bağlıdır ve genellikle yalnızca birkaç dakika sürer (117). Oluşan askorbik radikal ve dehidroaskorbik asit, en az üç ayrı enzim yolu ve glutatyon gibi biyolojik sistemlerdeki indirgeme bileşikleri tarafından askorbik aside geri indirgenebilir. İnsanlarda, askorbik aside geri indirgenme süreci kısmi olup, oksitlenen askorbik asidin tamamı geri kazanılmaz. Bir kısmı hidroliz yoluyla metabolize edilir ve kaybedilir (113).

Askorbik asit, karaciğer, beyin ve böbrek İRH modellerinde olumlu etkileri ile literatürde yer almış ve son organ koruması açısından faydalı sonuçlar göstermiştir. Askorbik asidin İRH cilt flebi modeli üzerindeki etkisiyle ilgili çeşitli çalışmalar bulunmaktadır (5). Zaccaria ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, sıçan epigastrik ada flebi İRH modelinde askorbik asidin etkileri incelenmiş ve askorbik asit grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranlarda flep sağkalımı gözlemlenmiştir (118).

C vitamini, antioksidan olarak bilinse de, aynı zamanda prooksidan olarak da davranabildiği saptanmıştır. C vitamini, indirgeyici bir ajan olduğundan dolayı; aynı zamanda Fenton reaksiyonu yoluyla serbest radikaller üreten metal iyonlarını da indirger. Bu redüksiyon sonucunda, Fe3+ ve bakır (Cu2+) iyonları, sırasıyla, Fe2+ ve Cu+ iyonlarına indirgenir. Bu durum da H2O2'nin hidroksil radikallerine dönüşmesini kolaylaştırır. C vitamini ile aracılık edilen Fenton reaksiyonları, insan vücudunda ferritin ve transferrin gibi metal bağlayıcı proteinler tarafından demir tutulumu sayesinde kontrol edilir (119). Prooksidan etkinin in vivo olarak geçerli olmayabileceği de öne sürülmüştür. Ancak yine de, yüksek demir seviyelerine sahip insanlarda C vitamini takviyeleri önerilmez (114).

2.7.3. Vitamin E

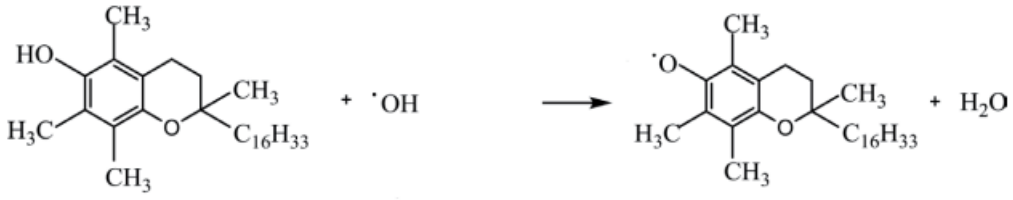
E vitamini, ilk olarak 1922 yılında Evans ve Bishop tarafından keşfedilmiştir. Sağlık için gerekli olan belirgin antioksidan aktiviteler göstermektedir. E vitamini, yağ içeren gıdalarda bulunur ve yağda çözünebilme özelliği sayesinde hayvan ve insan vücudundaki yağ dokularında depolanabilir. Bu nedenle her gün tüketilmesi gerekmez. E vitamini grubu, tokoferoller ve tokotrienoller olarak ikiye ayrılan

tokokromanoller olarak adlandırılır ve alfa-tokoferolün biyolojik aktivitesini niteliksel olarak gösteren tüm tokol ve tokotrienol türevlerini içerir (120).

E vitamini, alfa, beta, gama ve delta sınıflarındaki tokoferoller ve tokotrienoller olmak üzere oluşan sekiz farklı formda bulunur. Bu bileşikler, bitkiler tarafından homogentisik asitten sentezlenir. E vitamininin iki ana formu alfa ve gama-tokoferollerdir ve bunların relatif oranları kaynaklarına bağlı olarak değişir. E vitamininin en zengin diyet kaynakları, çeşitli homologları farklı oranlarda içeren yenilebilir bitkisel yağlardır (121).

İnsan vücudu, α-tokoferol transfer proteini (α-TTP) aktivitesi nedeniyle α-tokoferolü biriktirme eğilimindedir. α-TTP, karaciğerde yer alır ve plazmayı α-tokoferol ile zenginleştirir. Karaciğerde bulunan α-TTP'nin yanı sıra, tokoferol bağlayıcı proteinler sistemi, tokoferollerin ihtiyaç duyulan çeşitli insan dokularında lokalize olmasına neden olur (122).

Vitamin E'nin en dikkat çekici biyolojik işlevi, antioksidan kapasitesidir. Vitamin E, doğada bulunan en güçlü antioksidanlardan biri olarak geniş çapta kabul görmüştür. Bu antioksidan özelliği, fenolik hidrojen atomunu serbest radikalleri nötralize etmek için hızla transfer etme kapasitesine dayanır (Şekil 23). Bu sürecin devamlılığı, çoğunlukla vitamin C tarafından sağlanan yenilenme mekanizması sayesinde mümkün olur (123).



Şekil 23. Vitamin E tarafından hidroksil radikaline hidrojen atomu transferi (122)

Daha önce bahsedildiği üzere, vitamin E, membranlarda bulunan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve serbest radikal reaksiyonlarının yayılması sırasında reaktif oksijen türlerinin üretimini inhibe eden güçlü bir zincir kırıcı antioksidandır. Hücre ve organel membranlarında bulunur ve burada maksimum koruyucu etkisini gösterir. Vitamin E, membran lipid düzenliliğini artırarak, membranın daha sıkı bir yapıya sahip olmasına ve dolayısıyla hücrenin daha fazla stabiliteye sahip olmasına

olanak tanır (122). Howard ve arkadaşlarının 2011 yılında yaptığı bir çalışmada, vitamin E'nin iskelet kası homeostazının korunması için gerekli olduğu ve alfa-tokoferol ile kültürlenen miyositlere yapılan takviyenin plazma membran onarımını teşvik ettiği gösterilmiştir. Membran fosfolipitleri oksidanların temel hedeflerindendir ve vitamin E, lipid peroksidasyonunu etkin bir şekilde önler (124).

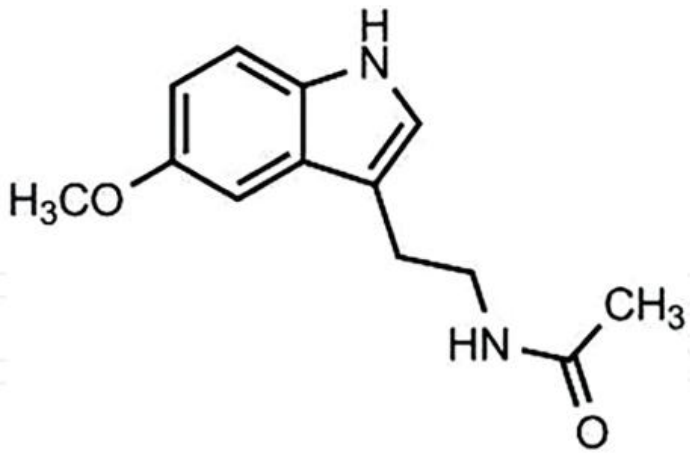
Alfa-tokoferolün endotel hücrelerindeki konsantrasyonunun artması, trombosit agregasyonunu inhibe eder ve endotelden prostasiklin salınımını artırır. Bu etkiler, intraselüler hücre adezyon molekülü (ICAM-1) ve vasküler hücre adezyon molekülü (VCAM-1) düzeylerinin azalması ile açıklanır. Adezyon moleküllerinin azalması, kan hücresi bileşenlerinin endotele yapışmasını azaltır. Ayrıca, vitamin E'nin araşidonik asit kaskadındaki etkisiyle, sitozolik fosfolipaz A2 ve siklooksijenaz-1 ekspresyonunun artması, prostasiklin salınımını artırır. Prostasiklin, güçlü bir vazodilatör ve trombosit agregasyonunun inhibe edici etkiye sahiptir (121). Bazı çalışmalar, tokoferollerin trombosit agregasyonunu protein kinaz C (PKC) inhibisyonu ve NOS'un artan etkisi aracılığıyla engellediğini öne sürmektedir. Bu durum, alfa-tokoferolün membran kökenli diasilgliserol üretimini azaltan etkisi ve PKC otofosforilasyonunu inhibe eden protein fosfataz tip 2A'nın aktivitesini artırması nedeniyle gerçekleşir (125).

Vitamin E'nin anlatılan özellikleri sebebiyle, literatürde birçok İRH modelinde etkileri araştırılmıştır. Franch ve arkadaşlarının çalışmasında, alfa-tokoferolün kontrol grubuyla karşılaştırıldığı bir sıçan karaciğer İRH modeli kullanılmıştır. Çalışmada, İRH döneminden sonra SOD, reperfüzyon döneminde katalaz ve tüm dönemlerde GSH-P aktivitelerinin, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu bulunmuştur (126). Benzer sonuçlar, Erkut ve arkadaşlarının çalışmasında da görülmüştür. Tavşan iskelet kası İRH modelinde yapılan araştırmada, alfa-tokoferol grubunda SOD, katalaz ve GSH-P seviyelerinin, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (127). İRH modelleri dışında kardiyovasküler hastalıklar, katarakt, kanser ve Alzheimer hastalığı üzerine olumlu etkilerinin olduğuna dair yayınlar mevcuttur (121).

2.7.4. Melatonin

Melatonin (N-asetil-5-metoksi-triptamin), birçok biyolojik ve fizyolojik süreçte rol oynayan ve çok işlevli bir indolamin bileşiğidir. Genellikle pineal bezde serotonin yoluyla triptofan metabolizması sonucunda sentezlenir. Moleküler formülü

C13H16N2O2 şeklindedir (Şekil 24). Melatonin, küçük moleküler boyutu ve yüksek lipofilikliği nedeniyle tüm biyolojik zarları geçme kapasitesine sahiptir ve kan-beyin bariyerini geçerek tüm biyolojik dokulara ve sıvılara eşit olarak dağılır (128).



Şekil 24. Melatoninin kimyasal yapısı (128)

Melatonin, pineal bezin pinealosit adı verilen hücrelerinde üretilen ve önemli fizyolojik hadiselerde rol oynayan bir hormondur. Sirkadiyen ritmin düzenlenmesi, uyku ve uyanıklık döngüsünün kontrolü, pubertal gelişim ve üreme süreçleri, motor aktivite, bağışıklık sistemi düzenlemesi, kan basıncının kontrolü, kusma ve hibernasyon gibi işlevlerde önemli bir etkisi vardır (129). Evrimsel süreçte melatonin, organizmaların oksijen kullanmaya başladığı dönemde ortaya çıkmıştır. İlk rolü, ROS'u nötralize etmek olarak belirlenmiştir. Melatoninin kimyasal yapısı zamanla değişmemiştir; ancak, evrim süreci boyunca antioksidan rolü korunmuş ve çeşitli diğer biyolojik işlevlerle desteklenmiştir (130).

Kan dolaşımına salındığında, melatonin, çok sayıda etki üretir ve bunlardan bazıları reseptör aracılıdır. İnsanlarda, bu etkileri gerçekleştiren iki reseptör (MT1 ve MT2) karakterize edilmiştir. MT1 ve MT2, çoğu periferik dokuda ve merkezi sinir sisteminde bulunur ve G protein-bağlantılı reseptörler ailesine ait transmembran reseptörlerdir. Bu reseptörler, adenil siklaz, fosfolipaz A2 ve fosfolipaz C gibi ikincil haberciler aracılığıyla etkilerini gösterir. Bu haberciler, siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve cGMP veya diasilgliserol ve inozitol trifosfat (IP3) üretimini değiştirir (131).

MT1 ve MT2 aracılı etkilerin yanı sıra birçok antioksidan etkiye de sahiptir. Bu etkilerden ilki, MT3 reseptörü aracılığıyla gerçekleştirilir. İlgili reseptör kinon redüktaz olarak işlev görerek kinonlardan elektron transferini inhibe eder ve oksidatif stresi azaltır (132).

Melatonin ayrıca elektron donörlüğü yaparak ROS ve RNS gibi maddeleri azaltır. Bu nedenle, melatonin yalnızca reseptörler aracılığıyla değil, aynı zamanda serbest radikal süpürücü olarak doğrudan da etki gösterir (133). Melatoninin serbest radikal süpürücü aktivitesi, elektron donörü özelliklerine sahip metabolitlerine de uzanır. İlgili metabolitler de antioksidan koruma sağlar. Bu mekanizma, melatoninin birinci, ikinci ve üçüncü nesil metabolitleriyle gerçekleşir ve bu sayede tek bir melatonin molekülü, on sefere dek redüksiyon sağlayabilir. Çok aşamalı antioksidan savunma sistemi, melatoninin ve metabolitlerinin oksidatif strese karşı geniş çapta hücresel ve moleküler koruma sağladığını göstermektedir (134).

Bu iki ana mekanizmanın yanı sıra, melatonin, MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığıyla antioksidan enzimlerin seviyelerini artırmaktan da sorumludur. Bu enzimler arasında SOD, GSH-P, glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz bulunur. Bu enzimlerin artışı, melatoninin dolaylı yoldan oksidatif hasarı azaltmasına neden olur (135).

Melatoninin NO sentezi ve dolaşımdaki miktarı üzerindeki etkilerini inceleyen birçok çalışma yapılmıştır. NO'nun fizyolojik etkisi, cGMP oluşturmasıyla gerçekleşir. Azalmış melatonin seviyesi, birçok dokuda guanilat siklaz aktivitesinin azalmasına neden olur. Sonuç olarak, cGMP seviyesi azalır ve cAMP seviyesi artar. Bu durum, hücre zarı kalınlığını ve sertliğini artırır ve dejeneratif hasar oluşumunu hızlandırır (136). Ayrıca, NO ve melatonin arasındaki ilişki incelendiğinde, NO ile O2'nin reaksiyona girmesi sonucu oluşan peroksinitrit anyonunun melatonin tarafından etkisiz hale getirildiği öne sürülmüştür (137).

Melatonin, belirgin anti-inflamatuar özelliklere de sahiptir. Anti-inflamatuar bir mediatör olan interlökin (IL) 10'un salgılanmasını artırırken, doku hasarından sorumlu olan TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini inhibe eder (138). Ayrıca, melatonin, miyokard enfarktüsü sonrası doku hasarına neden olan faktörlerden biri olan Toll benzeri reseptör 4 sinyal yolunu da inhibe eder (139).

Melatoninin bir diğer özelliği, lipofilik karakteri sayesinde hücre zarlarını kolayca geçebilmesidir. Bu özellik, melatoninin mitokondriye kolayca ulaşarak bu organelin fonksiyonlarını koruması açısından önem taşır. Melatonin, mitokondri içerisinde oksidatif stresi azaltır ve bu sayede mitokondri kaynaklı apopitotik yolakların gerçekleşmesine engel olur (140).

Bahsedilen bu özeliklerinden ötürü, melatoninin antioksidan etkisinin sonuçları, birçok deneysel İRH modelinde araştırılmıştır. Melatoninin, iskemik omurilik yaralanmasının tedavisinde etkili bir nöroprotektif ajan olabileceği gösterilmiştir (141). Ayrıca, Gurlek ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, melatoninin sıçan inferior epigastrik ada flebi modelinde modelinde faydalı etkileri gözlemlenmiştir. Çalışma, melatonin tedavisinin İRH kaynaklı flep nekrozunu azalttığını saptamıştır (142).

2.8. Total Antioksidan Kapasite

Biyolojik sistemlerde serbest radikal-antioksidan dengesini değerlendirmek için en sık kullanılan stratejilerden biri total antioksidan kapasitenin (TAC) belirlenmesidir. TAC'ı değerlendirmek için çeşitli testler kullanılır; bazıları geniş çapta kabul görmüşken, diğerleri deneysel modeller olarak sınırlı kalmıştır (143).

Antioksidan kapasiteyi ölçmeye yönelik metodolojik yaklaşımlar ilk olarak kan plazmasının, kimyasal olarak indüklenen bir substratın oksidasyonunu azaltma kapasitesini karakterize etmek için kullanılmıştır. Wayner ve arkadaşları, yöntemlerine "total peroksil radikal-yakalama antioksidan kapasitesi" adını vermişlerdir. Bu yöntem, biyolojik bir sistemin bileşenleri arasındaki sinerjistik veya antagonistik ilişkileri de içeren bütünsel bir antioksidan değerlendirmesi sağlamak amacıyla geliştirilmiştir (144). Yıllar sonra, antioksidan kapasite stratejilerinin ve testlerinin artan kullanımıyla birlikte, "TAC" terimi genel bir adlandırma olarak tanıtılmıştır. Günümüzde TAC araştırmaları, sadece plazma veya vücut sıvılarını değil, aynı zamanda gıdalar, içecekler ve birçok diğer biyolojik ve kimyasal sistemleri test etmek için kullanılan çeşitli farklı testleri içermektedir (145).

Kimyasal olarak, TAC değerlendirilmesi genellikle oksitlenebilir bir substratın (örneğin, floresan problar, lipidler, plazma, semen, tükürük) bir oksidan ile karşı karşıya bırakılmasına dayanır. Bu işlem, bir antioksidan varlığında veya yokluğunda maksimum oksidasyon seviyesini elde etmek amacıyla yapılır. Oksidasyonun

inhibisyon derecesi, belirli bir koruma derecesi sağlayan antioksidan miktarını tanımlar. Bu testlerin çoğu teknik olarak doğru ve uygulaması basit olduğu için TAC testleri geniş çapta kullanılmaktadır (143).

Antioksidanlar genellikle biyolojik veya kimyasal bir sistemin oksidasyonunu önleyen moleküller olarak tanımlanır. Basit kimyasal sistemlerde her iki tanım genellikle örtüşür; ancak daha karmaşık koşullarda (örneğin organizmalarda) kimyasal ve deneysel tanımlar farklılık gösterir (146). TAC testleri, bir kimyasal bileşiğin bir kimyasal sistemin oksidasyonunu önleme yeteneği ile bu bileşiğin in vivo bir antioksidan olma ve sağlık yararları sağlama potansiyeli arasındaki karmaşık yolda rol oynayan çeşitli faktörleri dikkate almaz. Bu durum, enzimler, sinyal molekülleri, membran bileşenleri gibi çeşitli faktörlerin rol oynadığı karmaşık biyolojik sistemlerde özellikle önemlidir; çünkü bu bileşenlerin oluşturduğu antioksidan savunma ağı herhangi bir TAC testi ile tam olarak değerlendirilemez (147).

TAC testlerinde, çözeltide sürekli bir radikal akışı üretmek için genel olarak termal radikal jeneratörleri kullanır. Çözeltilere bir antioksidanın eklenmesi durumunda, radikallerin nötralizasyonu açısından antioksidan maddeler problarla rekabet eder ve probların oksidasyonunu engeller veya yavaşlatır. TAC testleri, biyolojik örneklerde hücre dışı enzimatik olmayan antioksidan akviteyi değerlendirir. Farklı antioksidanların plazma konsantrasyonları bu testler kullanılarak ölçülebilir. Antioksidanları ölçen testler direkt veya dolaylı olarak sınıflandırılır. TAC'ı doğrudan ölçen testler, bir maddenin oksidasyonunu inhibe etme etkisine dayanır. En sık kullanılan direkt test, Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi (TEAC) testidir. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), E vitamini analogudur. Diğer direkt testler ise oksijen radikal absorbsiyon kapasitesi (ORAC) ve toplam radikal yakalama antioksidan parametresi (TRAP) testleridir (148). ORAC testinde, örnek peroksil radikalleriyle karşılaştırılır ve örnek tarafından indirgenmeyen peroksil radikalleri genellikle floresan probları kullanılarak tespit edilir (149). Bu nedenle, ORAC sadece peroksil-radikalleri yakalayabilen maddeleri değerlendirir.

En yaygın kullanılan dolaylı yöntemler, plazmanın ferrik iyon indirgeme antioksidan gücü (FRAP) ve kuprik indirgeme antioksidan kapasitesi (CUPRAC) testleridir. Her ikisi de bir örneğin metal kompleksini, sırasıyla Fe3+ ve Cu2+ indirgeme gücünü belirlemeye dayanır. Bu testler arasındaki önemli bir fark, TEAC, FRAP ve CUPRAC testleri spektrofotometre kullanılarak yapılırken, ORAC ve TRAP

testlerinin florimetre gerektirmesidir (148). Daha spesifik TAC testleri, bir sistemin singlet O2, O2-, H2O2 gibi belirli kimyasal türlerle reaksiyon kapasitesini değerlendirmek için de tasarlanabilir (150). Ancak tüm bu testlerde, farklı işlevi olan antioksidanların, antioksidan enzimlerin ve metal bağlayıcı proteinlerin etkileri değerlendirme dışı kalabilir (143).

TAC, çeşitli dokularda ve biyolojik sıvılarda ölçülmüştür; bunlar arasında kan/plazma/serum, beyin omurilik sıvısı, seminal plazma, foliküler sıvı, amniyotik sıvı, tükürük, gözyaşı ve idrar bulunur (151).

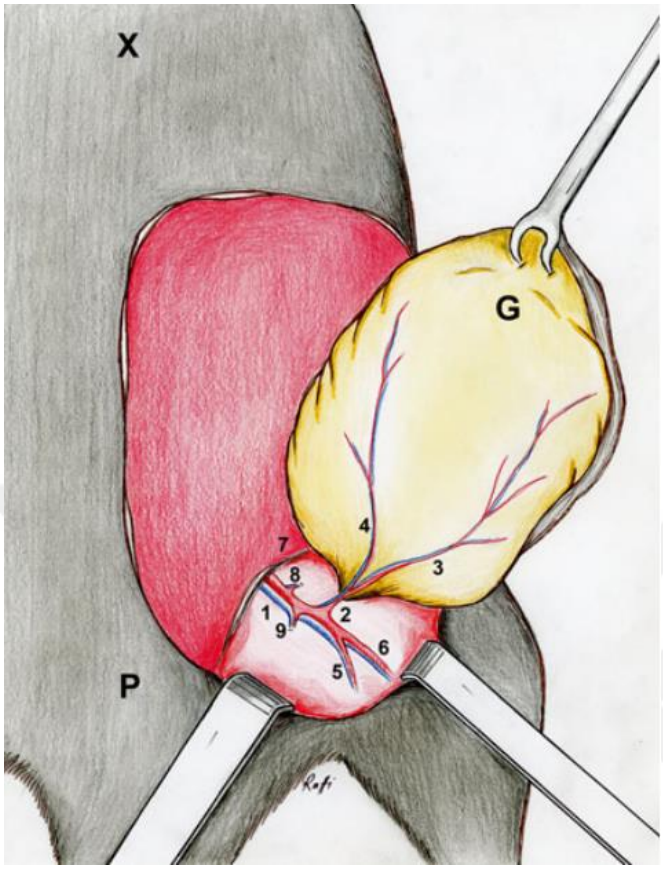
Sonuç olarak, TAC'ın dokularda ve vücut sıvılarında ölçülmesinin İRH çalışmalarındaki ana amacı, dokularda ve vücut sıvılarında oksidatif stres veya değişmiş redoks durumunda TAC değerlerindeki değişikliklerin tedavilerle olan ilişkisinin belirlenmesidir (143).

2.9. Sıçan İnferior Epigastrik Ada Flebi

1963 yılında Goldwyn ve arkadaşları, mikrocerrahi ile doku nakli için ilk hayvan deri flep modelini tanıtmışlardır. Bu model, köpeklerde yüzeyel inferior epigastrik damarları pedikül olarak kullanan ve "yüzeyel inferior epigastrik" veya "kasık flebi" olarak adlandırılan bir flep modeli olarak tanımlanmıştır (152). 1984 yılında Petry ve Wortham, yüzeyel inferior epigastrik pedikülün medial ve lateral uzantılarını tanımlamıştır ve bu uzantıların sıçanlarda tek taraflı aksiyel patern abdominal fleplerin tasarımındaki rolünü incelemiştir. (153).

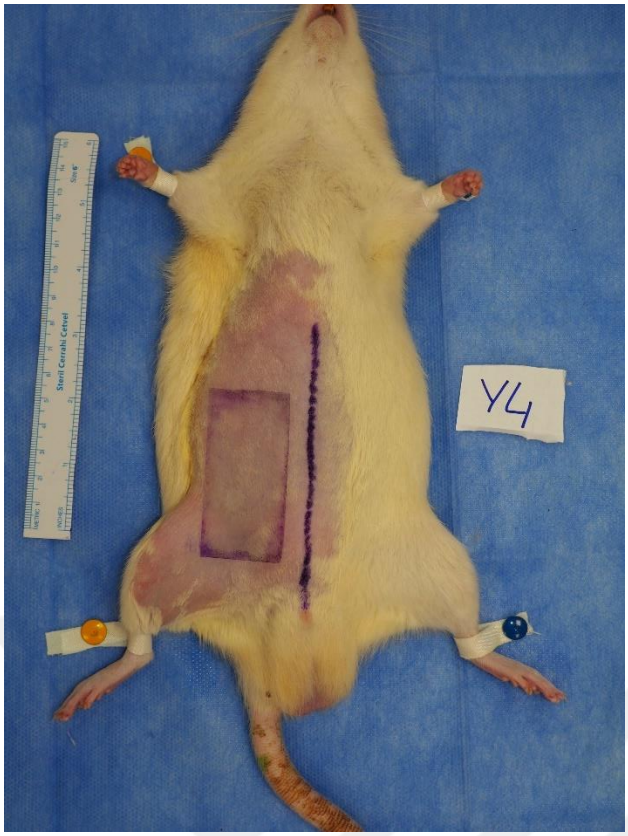
Kasık flebi veya inferior epigastrik ada flebi, adipokutanöz bir fleptir ve yüzeyel inferior epigastrik pedikül tarafından beslenir. Yüzeyel inferior epigastrik arter ve venin çapları sırasıyla 0.4 mm ve 0.5 mm'dir. İlgili pedikül femoral damarların ve sinirin vastus medialis ve adduktor magnus kasları arasındaki oluk boyunca ilerlediği uyluğun orta seviyesinde, femoral damarların yüzeyel kısmından dallanır. Bu noktadan itibaren, yüzeyel inferior epigastrik pedikül mediale ve superiora doğru kıvrılarak kasık derisini, uyluğun medial ve ekstansör yüzeylerini ve abdominal deriyi besler. Genellikle ana pedikül, medial ve lateral olmak üzere iki dala ayrılır, ancak dallanma paterninde değişiklikler gözlemlenebilir (Şekil 25). Daha büyük olan lateral dal, sıçanın orta-lateral bölgesine ve yukarıya doğru uzanarak muhtemelen lateral torasik arter ile göğüs duvarının yan tarafındaki damarlarla kollateral bağlantı kurar.

Daha küçük olan medial dal ise, göğüs derisinden gelen internal mammaryen arter ile kollateral bağlantı kurarak medial abdominal bölgeye ilerler (154).



Şekil 25. İnferior epigastrik ada flebinin damarsal anatomisi (154)

İnferior epigastrik ada flebi, inferiorda kasıktan başlayıp superiorda ksifoide kadar ve medialde orta hattan başlayarak lateralde abdominal derinin kürk yapısında değişiklik gösterdiği noktaya kadar uzanacak şekilde tasarlanabilir. Bu şekilde tasarlanan bir flebin tamamen hayatta kalması beklenir. Flebin tasarımını belirlemek amacıyla kasık ve abdomen üzerinde standart bir şablon kullanılması pratik bir yaklaşımdır (Şekil 26). Medialden laterale ve kaudaldan sefalada flebin uzunluğu, kullanılan sıçanın boyutuna bağlı olarak sırasıyla 4.5 cm ve 9 cm arasında değişebilir. Bununla birlikte, flebin boyutu ve tasarımı, spesifik bir çalışmaya uygun olacak şekilde modifiye edilebilir (154).



Şekil 26. İnferior epigastrik ada flebinin standart şablon ile tasarımı

Cerrahi alan, alkol veya betadin ile sterilize edilmelidir. Diseksiyon sırasında, medial sınır insizyonunun önce yapılması daha güvenli olabilir; çünkü bu insizyon cildin kaldırılmasını ve lateral yönde diseke edilmesini sağlar. Böylece alttaki aksiyel damarların doğrudan görülmesi mümkün olur. Medial ve inferior yöndeki diseksiyon, kasık yağ yastığını da içerecek şekilde genişletilir. Sonrasında flebin kalan superior ve lateral sınırları boyunca insizyonlar yapılır. Superior epigastrik damarlar, genellikle flebin superior kenarında koterize edilmelidir. Lateralde, yüzeyel inferior epigastrik pedikülün dallarından kaynaklanan kanamalar olabilir; bu kanamalar koter ile kolayca kontrol edilebilir. İnferior kenardaki diseksiyonda, inferior epigastrik damarların yağ yastığının içine girdiği bölgeyi korumak amacıyla inguinal yağ yastığı ile üzerindeki deri arasında bir plan oluşturulmalıdır. Bu işlem, dikkatli bir makas diseksiyonu ile basitçe gerçekleştirilebilir. Son olarak, femoral damarlar tanımlanarak, yüzeyel inferior epigastrik damarların dallandığı alanın diseksiyonu sağlanır. Tüm flep, abdominal sahadan tamamen serbestleştirilir (Şekil 27) ve sadece yüzeyel inferior epigastrik damarlara pediküllü hale getirilerek aksiyel patern ada flebi modeli oluşturulur (154).



Şekil 27. Pediküllü inferior epigastrik ada flebi modeli

Sonuç olarak bu flep modeli, ekonomik, pratik ve etkili bir araştırma aracı kullanılmaktadır. Günümüze dek, temel flep hayatta kalma mekanizmalarından ileri cerrahi tasarımların geliştirilmesine kadar birçok araştırma sorusunun incelenmesinde kullanılmıştır ve bu nedenle geniş bir popülerlik kazanmıştır. İRH (142) başta olmak üzere flep prefabrikasyonu (155), arteriyovenöz fistül (156), mikrovasküler oto ve allogreftlerin test edilmesi (157) gibi konuların araştırılmasında yaygın olarak kullanılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmanın başlangıcı öncesi İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı'na başvurularak 2023/43 sayılı etik kurul onayı alındı. Tüm çalışma boyunca etik kurul kurallarına uygun hareket edildi. Çalışmanın hayvan deneyi prosedürleri İstanbul Üniversitesi-Cerrahpaşa'ya bağlı Deneysel Tıp Araştırma Laboratuvarı'nda (DETALAB) gerçekleştirildi.

Çalışma sürecinde 40 adet, 500-620 gram ağırlığında, erkek cinsiyette, 10 aylık, Wistar Albino cins sıçan kullanıldı. Çalışma sırasında 4 hayvanın kendine zarar vermesi ve bir hayvanın enjeksiyonlar sırasında ölmesi nedeniyle çalışmadan çıkarıldı. Bu hayvanların yerine 5 adet aynı özelliklere sahip hayvan çalışmaya dahil edildi.

Hayvanların bakımı, 21-22℃ oda sıcaklığında, 12 saat gündüz, 12 saat gece fotoperiyodunda, %18-%20 protein içeren pellet sıçan yemi kullanılarak, her kafeste operasyonlar öncesi 4 hayvan, operasyonlar sonrası her kafeste tek hayvan olmak üzere polikarbonat kafesler içerisinde yapıldı.

Çalışma genel olarak 13 basamaktan oluşmaktadır.

1) Hayvanların gruplandırılması ve tasnifi
2) Antioksidan ajanların hazırlanması ve enjeksiyonu
3) Cerrahi prosedür
4) Postoperatif 24. Saatte kuyruk veninden kan alımı
5) Postoperatif bakım
6) Postoperatif dönemde enjeksiyonların devamı
7) Fotoğrafik verilerin elde edilmesi
8) Doku biyopsilerinin alınması
9) Hayvanların sakrifikasyonu ve intrakardiyak kan alımı
10) Elde edilen örneklerin saklanması ve transferi
11) Fotoğrafik değerlendirme

12) Histopatolojik değerlendirme

13) Biyokimyasal değerlendirme

14) İstatistiksel Değerlendirme

3.1. Hayvanların gruplandırılması ve tasnifi

Çalışma dahilindeki 40 adet sıçan rastgele 5 gruba ayrıldı. Her grupta 8 hayvan yer aldı.

- Grup 1, İnferior epigastrik ada flebi kaldırılan, iskemi-reperfüzyon oluşturulmayan, serum fizyolojik (SF) enjeksiyonu yapılan grup (KR)
- Grup 2, İnferior epigastrik ada flebi kaldırılan, iskemi-reperfüzyon oluşturulan, SF enjeksiyonu yapılan grup (İR)
- Grup 3, İnferior epigastrik ada flebi kaldırılan, iskemi-reperfüzyon oluşturulan, preoperatif 1. Haftada Vitamin C+E ve melatonin enjeksiyonu başlanan grup (İ7)
- Grup 4, İnferior epigastrik ada flebi kaldırılan, iskemi-reperfüzyon oluşturulan, iskemiden 30 dakika önce Vitamin C+E ve melatonin enjeksiyonu başlanan grup (İY)
- Grup 5, İnferior epigastrik ada flebi kaldırılan, iskemi-reperfüzyon oluşturulan, reperfüzyondan 30 dakika önce Vitamin C+E ve melatonin enjeksiyonu başlanan grup (RY)

Tüm gruplara preoperatif 7. Günden postoperatif 7. Güne dek intraperitoneal enjeksiyon uygulandı. Antioksidan ajan uygulanmayan gruplara ilgili günlerde aynı hacimde SF enjeksiyonu yapıldı. İY ve RY gruplarına da antioksidan başlangıç gününe kadar SF enjeksiyonu uygulandı. Antioksidan ajan başlanan gruplara da postoperatif 7. Güne dek günlük antioksidan uygulaması devam etti.

Preoperatif dönemde, her kafeste 4 hayvan olacak şekilde bakımları yapıldı. Toplamda 10 kafes kullanıldı. Hayvanların tasnifi ve isimlendirilmesi açısından kafesler numaralandırıldı (Şekil 28).



Şekil 28. Hayvanların her kafeste dörderli olarak bakımı

Ayrıca her kafeste bulunan hayvanların kuyruklarının kök kısmı kırmızı, mavi, yeşil ve sarı renklere boyandı (Şekil 29). Böylece hayvanların isimlendirilmesi mümkün oldu. Örneğin ; 8 numaralı kafesteki mavi renkli hayvan ‘’M8’’ olarak isimlendirildi.

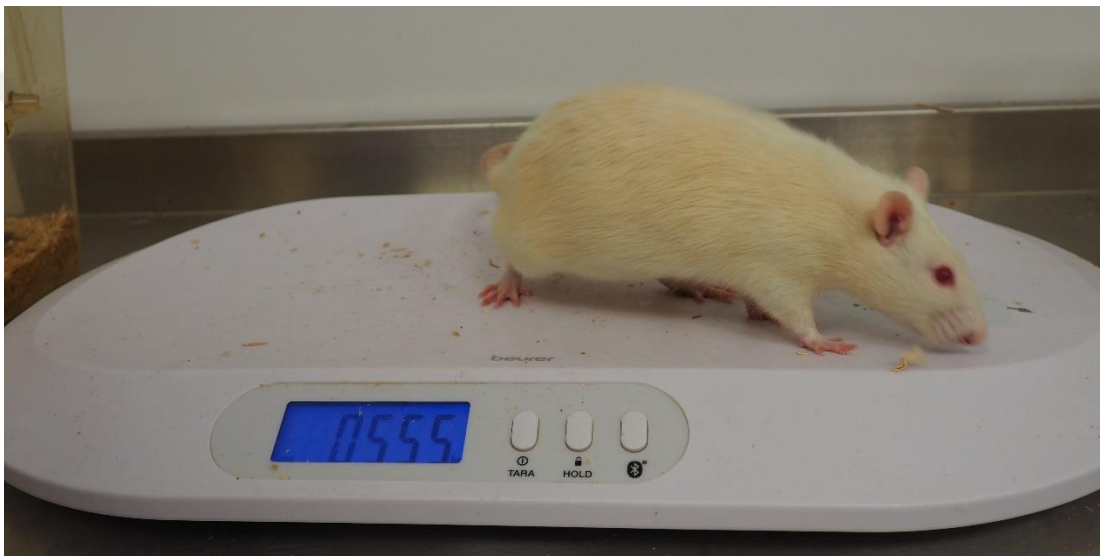


Şekil 29. Hayvanların tasnifi açısından kuyruklarının boyanması

3.2. Antioksidan ajanların hazırlanması ve enjeksiyonu

Hayvanlara tüm enjeksiyonlar intraperitoneal olarak uygulandı. Uygulanan antioksidan ön tedavisi; Vitamin C 200mg/kg, Vitamin E 40mg/kg ve melatonin 10mg/kg dozlarında kombine olarak belirlendi. Antioksidan uygulanmayan gruplara aynı günlerde SF enjekte edildi. SF enjeksiyonları da antioksidan tedavi hacmi ile aynı miktarda uygunlandı. Böylece hayvan stres faktörünün ve hidrasyon miktarının eşitlenmesi amaçlandı.

Tüm enjeksiyonlar öncesi hayvanlar tartıldı (Şekil 30). Antioksidan ön tedavi dozları ve SF hacimleri tartı sonuçlarına göre ayarlandı.



Şekil 30. Hayvanların enjeksiyonlar öncesi tartılması

Melatonin uygulaması açısından 5 gram toz halinde melatonin (Cayman Chemical Company Item : 14427) temin edildi (Şekil 31). Toz halindeki çözdürülmemiş melatonin -20 derece sıcaklıkta saklandı.



Şekil 31. Toz halinde melatonin

Uygun dozda melatonin hazırlanması açısından, toz halindeki melatonin çözülmeden önce hassas tartıda tartıldı (Şekil 32).



Şekil 32. Toz halindeki melatoninin hassas tartıda tartılması

Uygun ağırlıkta toz melatonin tartıldıktan sonra enjekte edilebilmesi açısından dimetil sülfoksit içerisinde 1 gr/100 ml ölçüsünde çözdürüldü (Şekil 32). Böylece enjeksiyona hazır hale getirildi.



Şekil 33. Toz halindeki melatoninin dimetil sülfoksit içerisinde çözdürülmesi

Vitamin C enjeksiyonları için 500mg Vitamin C (askorbik asit) içeren 5ml'lik ampuller (REDOX-C® Ampul 500 mg / 5 ml) temin edildi (Şekil 33). Enjekte edilebilir formda olması nedeniyle enjeksiyon öncesi ek prosedür uygulanmadı. Hayvanların tartılması sonrası uygun hacimde enjektöre çekilip uygulaması yapıldı.



Şekil 34. Temin edilen Vitamin C

Vitamin E enjeksiyonları için ise 300mg dl-alfa tokoferol asetat içeren 2ml'lik ampuller (Evigen 2 ml Ampul) temin edildi (Şekil 34). Bu maddenin de hazır enjekte edilebilir formda olması nedeniyle enjeksiyon öncesi ek prosedür uygulanmadı. Tartılara göre uygun hacimde enjektöre çekilip uygulandı.



Şekil 35. Temin edilen Vitamin E

Preoperatif 7. Günde sadece Grup 3 (İ7)'e kombine antioksidan tedavi başlandı. Operasyon gününe dek diğer gruplara aynı hacimde SF enjeksiyonu yapıldı. Operasyon gününde Grup 4 (İY)'e iskemiden yarım saat önce, Grup 5 (RY)'e reperfüzyondan yarım saat önce kombine antioksidan tedavi başlandı. Sonraki günlerde postoperatif 7. Güne dek Grup 3-4-5'e günlük kombine antioksidan tedaviye devam edildi. Grup 1 (KR) ve 2 (İR)'ye ise her deney gününde SF enjeksiyonu yapıldı.

Tüm enjeksiyonlar hayvanların sol abdominal bölgesine intraperitoneal (ip.) olarak uygulandı. Enjeksiyonlar için 1ml'lik, 26 Gauge uçlu enjektörler kullanıldı (Şekil 35). Tüm antioksidanlar farklı enjektörlere hazırlanıp üç ayrı enjeksiyonla uygulandı. Enjeksiyon sırasında intraperitoneal alana geçildiğinde negatif basınçla aspirasyon sağlanıp barsak veya batın içeriği gelip gelmediği kontrol edildi.



Şekil 36. Sol abdominal bölgeye intraperitoneal enjeksiyon

3.3. Cerrahi Prosedür

Operasyon gününde, tüm hayvanların sağ kasık bölgesinden abdominal bölgesine kadar uzanan 6*3cm'lik inferior süperfisyal epigastrik pedikül bazlı ada flebi kaldırıldı. İlgili pedikülün femoral arter ve venden dallandığı bölgenin proksimali ve distali diseke edildi. Pedikülün çıktığı alanın proksimaline ve distaline mikroklemp yerleştirildi. Sonrasında flep yerine adapte edildi. 8 saat sonra flebin inferiorundaki sütürleri alındı ve mikroklempler çıkarıldı. Pedikül üzerinde milking testi yapılıp akımın salim olduğu izlenince flep yerine tekrardan sütüre edildi.

Operasyon gününde de grupların ilgili enjeksiyonlarına devam edildi. Cerrahi prosedürler sırasında, Grup 4'e iskemiden yarım saat önce, Grup 5'e reperfüzyondan yarım saat önce kombine antioksidan tedavi başlandı.

Cerrahi prosedür öncesinde tüm sıçanlara anestezi amacıyla ketamin (Ketasol %10) 75 mg/kg ve ksilazin (Beltazyn %2) 8 mg/kg dozunda uygulandı (Şekil 36). Anestezik ajanlar ip. yolla enjekte edildi.



Şekil 37. Anestezi amaçlı kullanılan ketamin ve ksilazin formları

Anesteziye girdiğinden emin olunduktan sonra hayvanların sağ kasık ve abdominal bölgelerini içerecek şekilde tıraş edildi (Şekil 37). Ardından operasyon masasına alındı. Operasyon sahasının üzerinde cerrahi steril örtü kullanıldı. Raptiye ve ipek bantlar yardımı ile abdominal bölgenin gerilerek cerrahiye hazır hale gelmesi sağlandı.



Şekil 38. Hayvanların operasyon öncesi tıraş edilmesi

Cerraki prosedürler sırasında bir cerrahi biyopsi seti ve bir mikrocerrahi set kullanıldı (Şekil 38). Biyopsi seti içerisinde; bir portegü, iki Adson penset, bir bistüri

sapı, bir ip makası, bir Stevens makas ve bir iris makası yer almaktaydı. Mikrocerrahi set içerisinde ise; iki kuyumcu penseti ve bir mikro kıvrık uçlu makas kullanıldı.

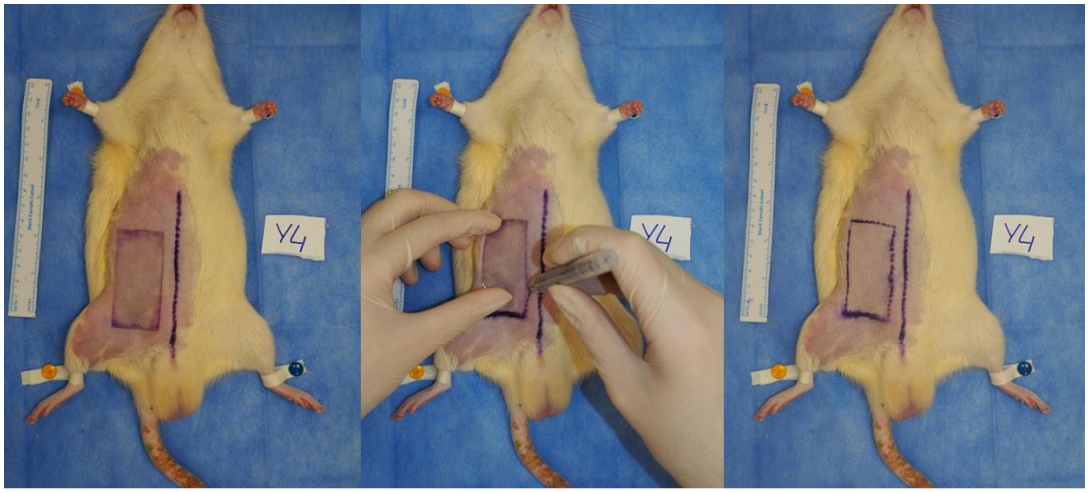


Şekil 39. Kullanılan cerrahi aletler

Operasyona başlamadan önce cerrahi saha alkol ile temizlendi (Şekil 39). Cerrahi çizim açısından daha önceden asetat kağıdından hazırlanan 6*3cmlik dikdörtgen şekilli kalıp kullanıldı (Şekil 40). Flep sınırlarının çizimi öncesi abdominal bölgede orta hat belirlendi. Orta hat steril cerrahi işaretleme kalemi ile çizildi. Ardından sağ inguinal ligaman palpe edildi. İnguinal ligamanın hemen üzerine kalıbın alt kenarı gelecek şekilde kalıp yerleştirildi. Kalıp yerleştirilirken medialde orta hattı geçmemesine ve lateralde kürk yapısının değiştiği sınırı geçmemesine dikkat edildi. Sonrasında flebin sınırları çizildi.

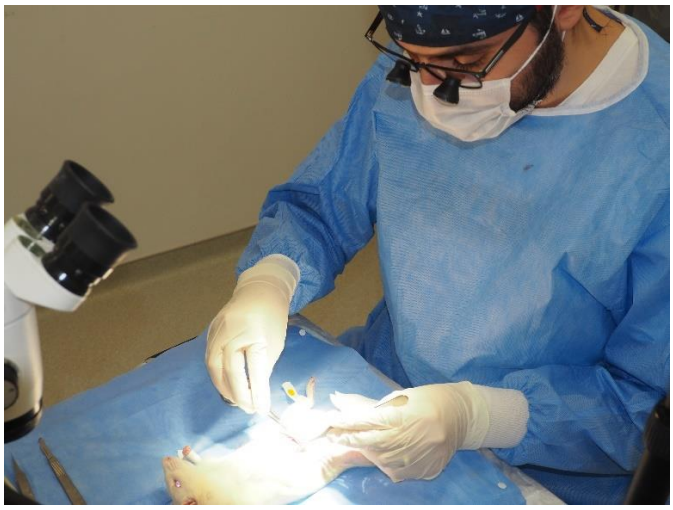


Şekil 40. Cerrahi prosedür öncesi cerrahi sahanın alkol ile silinmesi

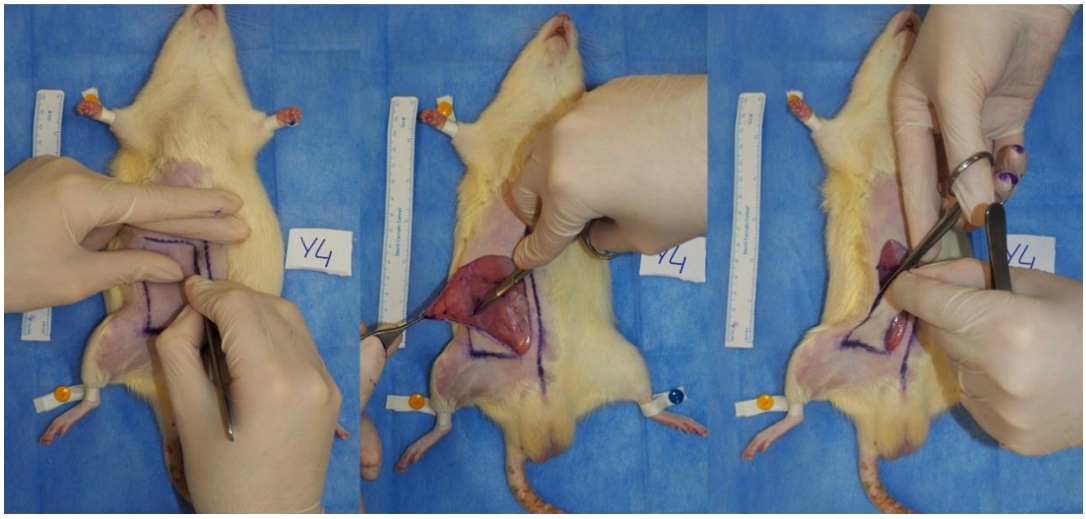


Şekil 41. Kalıp yardımı ile standardize flep sınırlarının çizimi

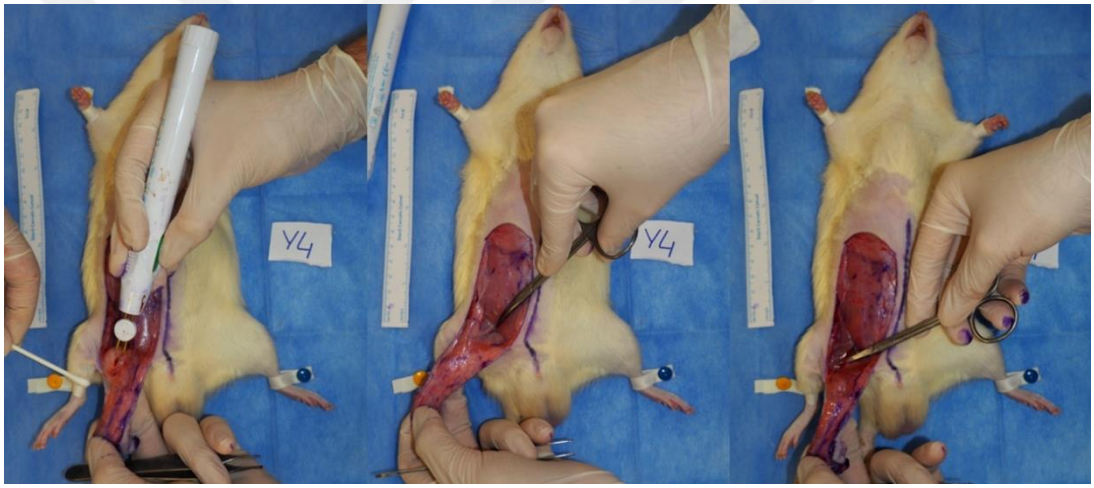
Flebin kaldırılması sırasında 2.5x büyütme sağlayan loupe gözlük kullanıldı (Şekil 41). Flep çiziminin ardından 15 numaralı bistürü yardımı ile flebin medial kenarından insizyona başlandı. Ardından üst kenar insize edildi. Flep, superomedialden inferolaterale doğru tabanda abdominal kaslar üzerinden adipokutanöz olacak şekilde kaldırıldı. Diseksiyon flep lateral sınırına geldiğinde flebin lateral insizyonu yapıldı (Şekil 42). Flep lateralinde pedikülün lateral dallarından meydana gelen kanamalar koterize edilerek durduruldu. Flebin inferiorunda, tabanda pedikülün flebe girdiği gözlendi. Pedikül, çevresindeki inguinal yağlı dokudan künt bir şekilde diseke edildi (Şekil 43). Sonrasında flebin alt kenar insizyonu pedikül korunarak dikkatli bir şekilde tamamlandı. Flep ada flebi haline geldikten sonra pedikül, femoral paketten çıktığı alana dek çevreden diseke edildip serbestlendi (Şekil 44).



Şekil 42. Flep kaldırılırken loupe gözlük kullanımı



Şekil 43. Flebin medial, superior ve lateral kenardan insize edilip tabandan kaldırılması

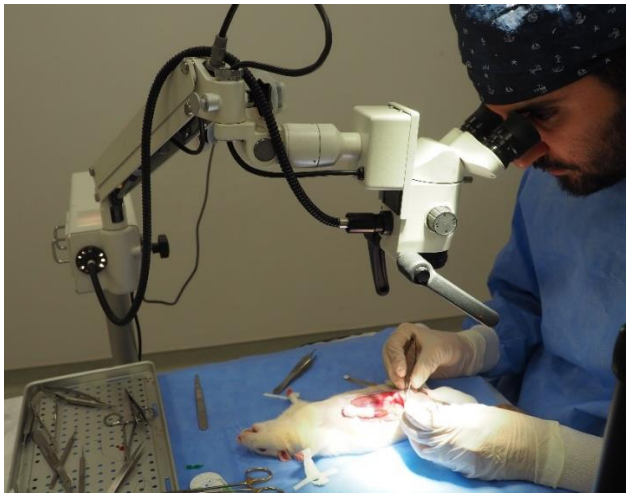


Şekil 44. Kanamaların koter yardımı ile durdurulması, pedikülün flebe girdiği alanın gözlenmesi ve pedikülün çevre dokudan künt diseksiyonu

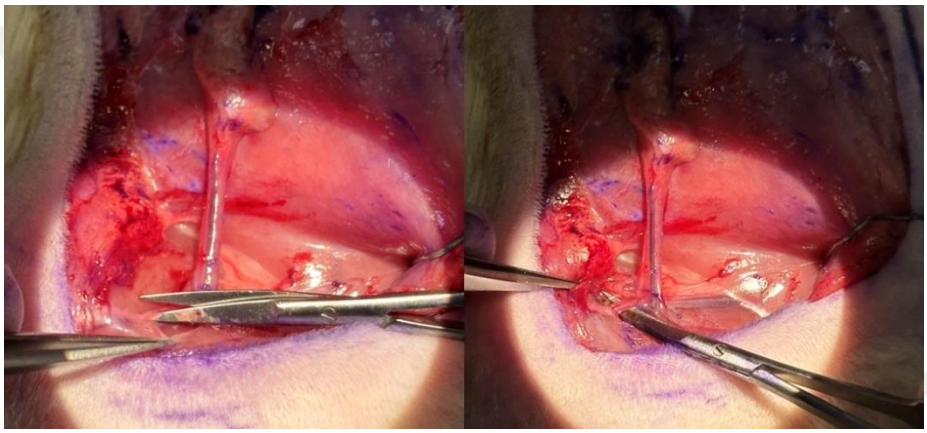


Şekil 45. Flebin alt kenar insizyonunu takiben pedikül diseksiyonunun tamamlanması

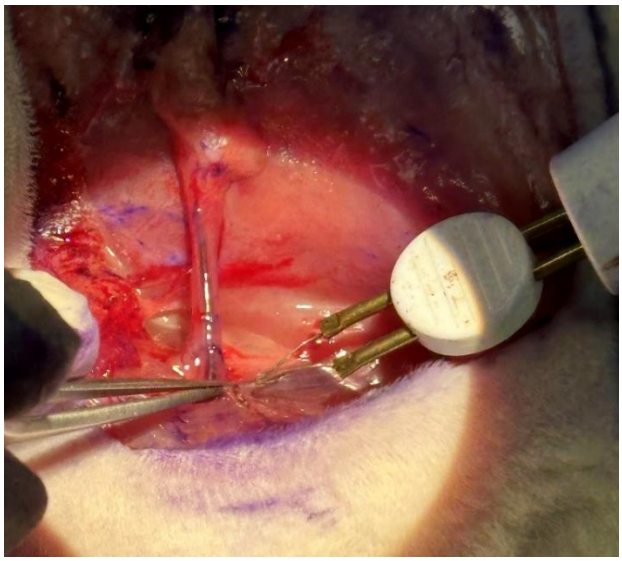
Ada flebi kaldırıldıktan sonra femoral paketin diseksiyonu amaçlı mikroskop kullanıldı (Şekil 45). Mikroskop altında ilk olarak, pedikülün femoral paketten çıktığı alanın distalinde femoral kılıf açıldı. Femoral arter ve ven, çevre dokulardan ve femoral sinirden künt diseksiyon yardımı ile ayırıldı (Şekil 46). Sonrasında inferior epigastrik pedikülün dallandığı alana yakın mesafede çıkan Murphy dalı koterize edildi (Şekil 47). Pedikülün proksimalinde femoral paketin kılıfı tekrardan açıldı. Femoral arter ve ven, femoral sinir ve çevredeki dokulardan diseke edildi. Pedikülün femoral paketten dallandığı alan dışında ek bir bağlantısı kalmadığından emin olundu (Şekil 48). Pedikülün proksimaline ve distaline femoral arter ve veni birlikte oklüde edecek şekilde birer adet mikroklemp (Bear Medical TKF-1-15C ven için tekli klemp) yerleştirildi (Şekil 49). İskemi saati not edildi.



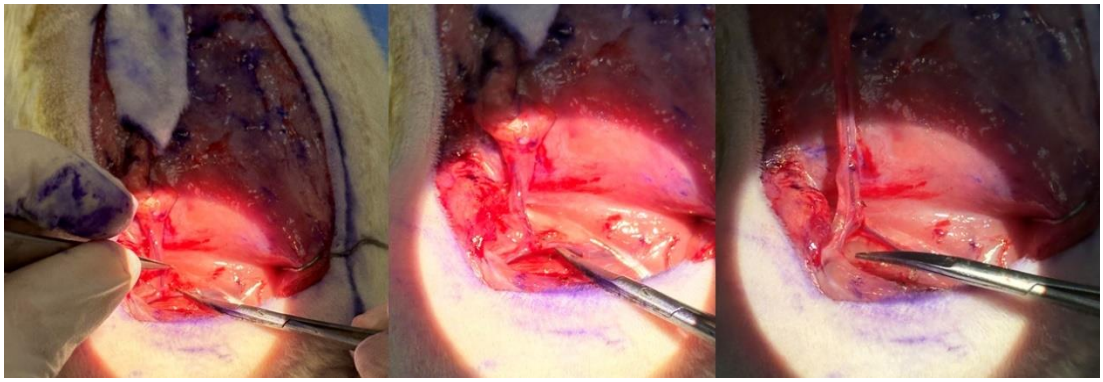
Şekil 46. Femoral paketin diseksiyonu amacıyla mikroskop kullanımı



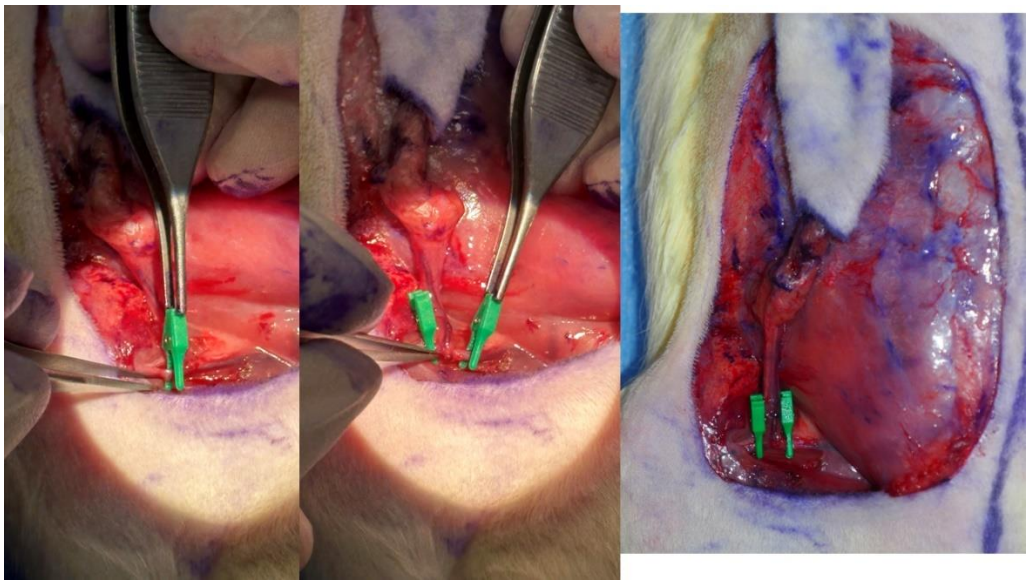
Şekil 47. Pedikülün distalinde femoral arter ve venin diseke edilmesi



Şekil 48. Murphy dalının koterize edilmesi



Şekil 49. Pedikülün proksimalinde femoral arter ve venin diseke edilmesi, ardından femoral paketin tabandan serbestlenmesi

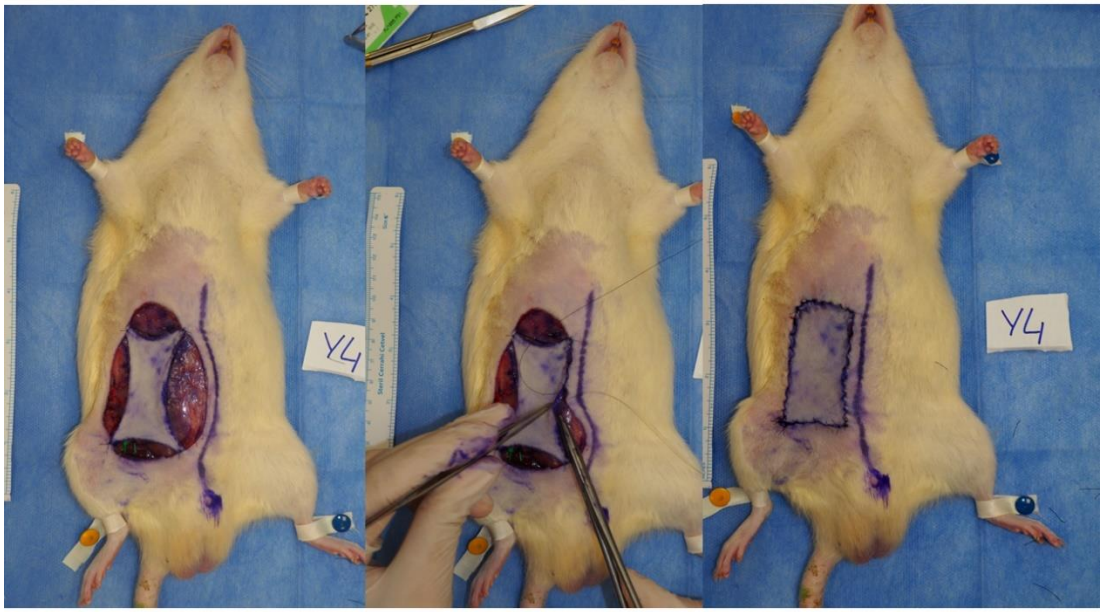


Şekil 50. Pedikülün proksimaline ve distaline mikroklemp yerleştirilmesi

İskemi başlatıldıktan sonra flebin yerine adapte edilmesine başlandı. Sütürizasyon için 5-0 naylon keskin iğneli sütür materyali (ETHILON™) kullanıldı (Şekil 50). İlk olarak flebin tüm köşeleri separe olarak sütüre edildi. Ardından tüm kenarlar ayrı olarak devamlı olarak sütüre edildi (Şekil 51).

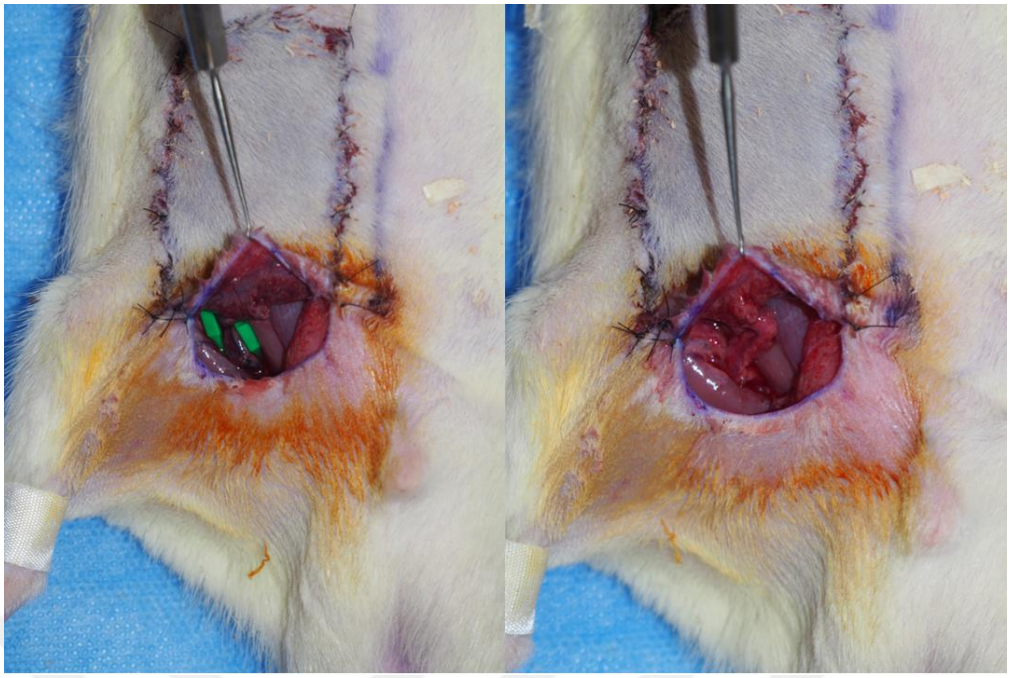


Şekil 51. 5-0 naylon keskin iğne uçlu sütür materyali

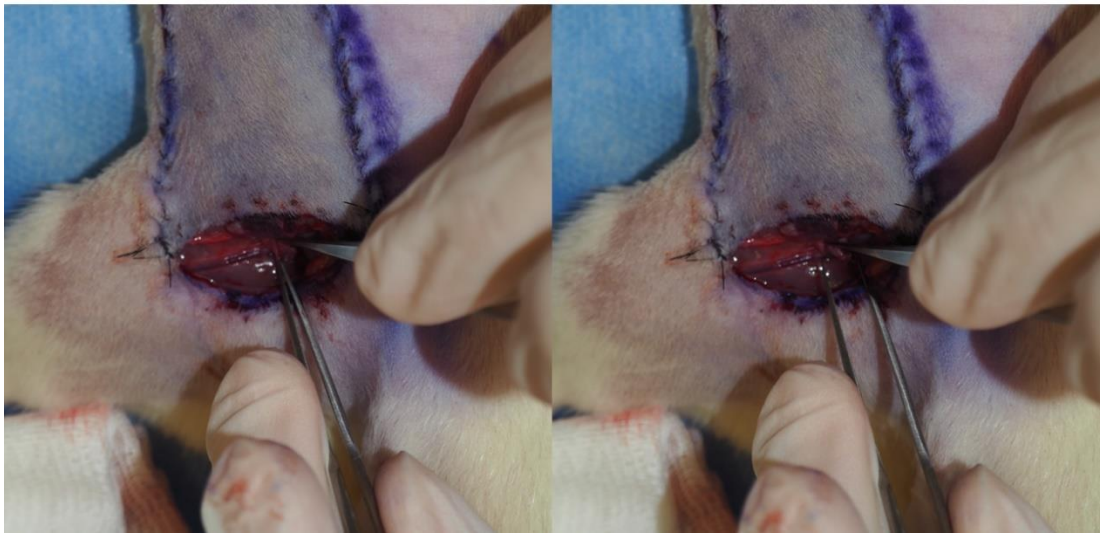


Şekil 52. Flebin yerine adapte edilmesi

İskemiden 8 saat sonra hayvanlara ketamin (Ketasol %10) 37,5 mg/kg ve ksilazin (Beltazyn %2) 4 mg/kg dozunda uygulanarak tekrardan anesteziye alındı. İnferior kenardaki tüm sütürler alındı ve mikroklemplerin çıkarılması için cerrahi alan oluşturuldu. Mikroklempler çıkarıldı. Flebin cilt altı yağlı dokusundaki renk değişimi izlendi (Şekil 52). Reperfüzyonun sağlandığından emin olunması açısından milking testi hem pedikül hem de femoral arter ve ven üzerinde uygulandı (Şekil 53). Reperfüzyon sağlandığı gözlendikten sonra flebin inferior kenarı tekrardan sütüre edildi.

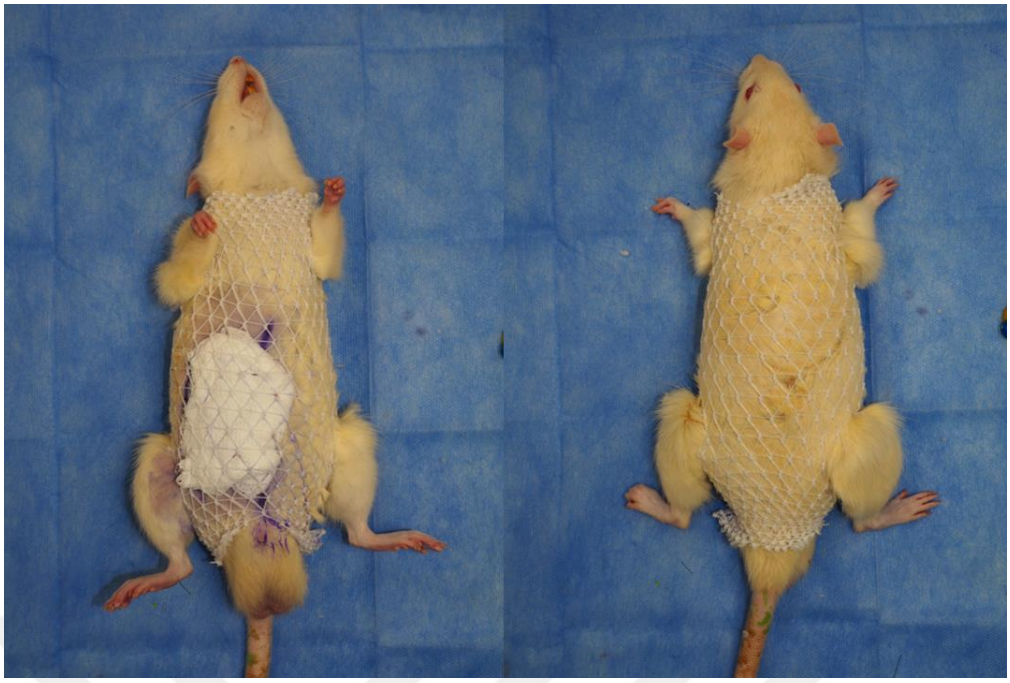


Şekil 53. Mikroklemplerin çıkarılması ve reperfüzyon sonrası cilt altı dokudaki renk değişimi



Şekil 54. Milking testi ile akımın salim olduğunun tayini

Cerrahi işlemler sonrası, hayvanların kendilerine ve fleplerine zarar vermemesi açısından gazlı bez ve file sargı (Setanet Elastik File Bandaj No:2) kullanılarak pansumanları yapıldı (Şekil 54). Flep alanına gazlı bez koyuldu. File sargı, her hayvan için 15 cm olacak şekilde kesildi. Ön ve arka ekstremitelerinin içinden geçmesi için uygun delikler açıldı. File sargı hayvanlara giydirildi. İlgili pansuman postoperatif 1. Günde kuyruk veninden kan alımı sonrasına dek tutuldu.



Şekil 55. Operasyon sonrası gazlı bez ve file sargı ile pansuman

3.4. Postoperatif 24. saatte kuyruk veninden kan alımı

Postoperatif 24. Saatte tüm hayvanlardan TAC ölçümü amacıyla kuyruk veninden kan örneği alındı. İşleme başlamadan önce ketamin 37,5 mg/kg ve ksilazin 4 mg/kg dozunda uygulanarak, hayvanlar anesteziye alındı.

Kan alımı için 24 Gauge'lik sarı renk intravenöz kanüller kullanıldı. Kuyruğun en distalinden denemeye başlanarak kanülasyon uygulandı. Kanülün ven içerisinde olduğu teyit edildikten sonra enjektörü çıkarıldı. Kuyruk sarkıtılarak, yer çekiminin de etkisiyle, damla damla kan örneği kırmızı kapaklı biyokimya tüpüne toplandı (Şekil 55).

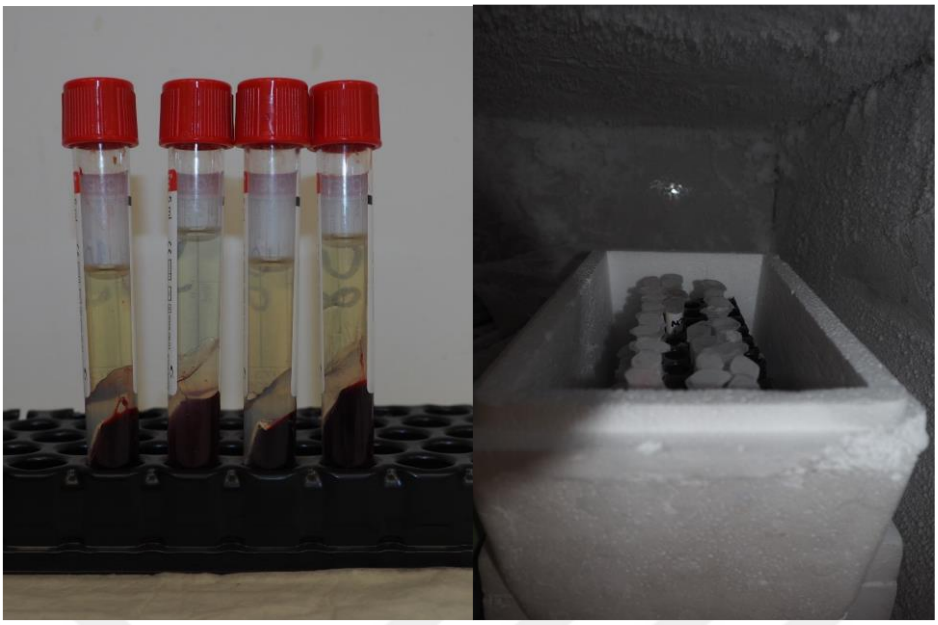


Şekil 56. Kuyruk veninden kan alımı

Yeterli kan örneği toplandıktan sonra, biyokimya tüpleri 30 dakika boyunca dik bir şekilde bekletildi. Ardından 10 dakika boyunca 3000rpm ile santrifüj edildi (Şekil 56). Santrifüj sonrası üstte kalan serum pipet yardımı ile eppendorf tüplere alındı. Eppendorf tüpleri de ivedilikle laboratuvar bünyesinde bulunan soğutucuya transfer edilerek -80 derecede saklandı (Şekil 57).



Şekil 57. Biyokimya tüplerinin dik olarak bekletilmesi ve ardından santrifüj edilmesi



Şekil 58. Santrifüj sonrası serum eldesi ve sonrasında eppendorf tüpler içerisinde -80 derecede saklanması

3.5. Postoperatif bakım

Kuyruk veninden kan alımı tamamlandıktan sonra, hayvanların anesteziden çıkması beklendi. Ardından hayvanların abdominal bölgesi, kendilerine zarar vermemesi için, file pansumanlarının üzerinden koban bandajı ile sarıldı (Şekil 58). Solunum problemi gelişip gelişmediği gözlendi. Sonrasında, ek stres faktörü oluşturmaması açısından, file pansumanın ön bacakları çıkarıldı (Şekil 59).

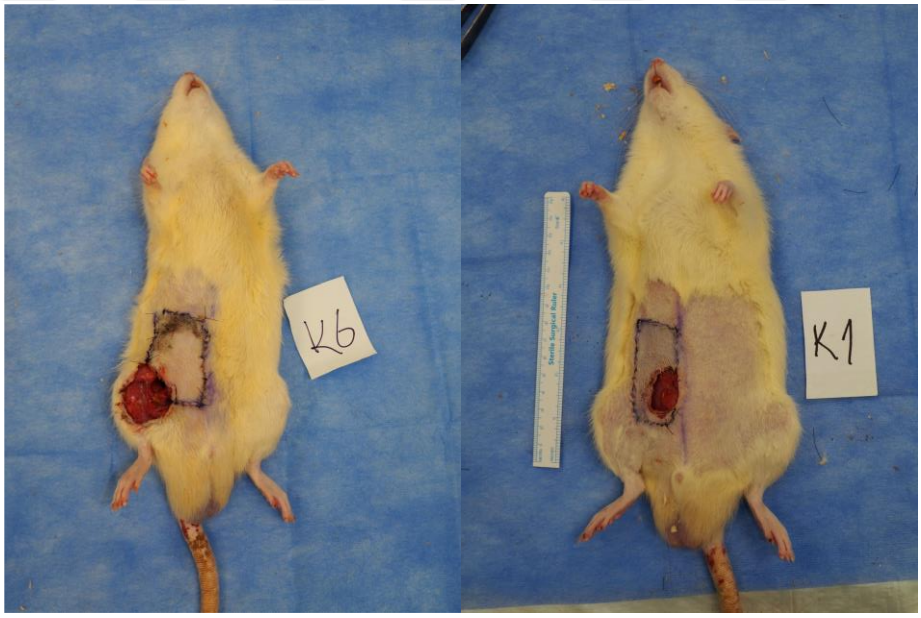


Şekil 59. Koban bandaj ile abdominal bölgenin sarılması



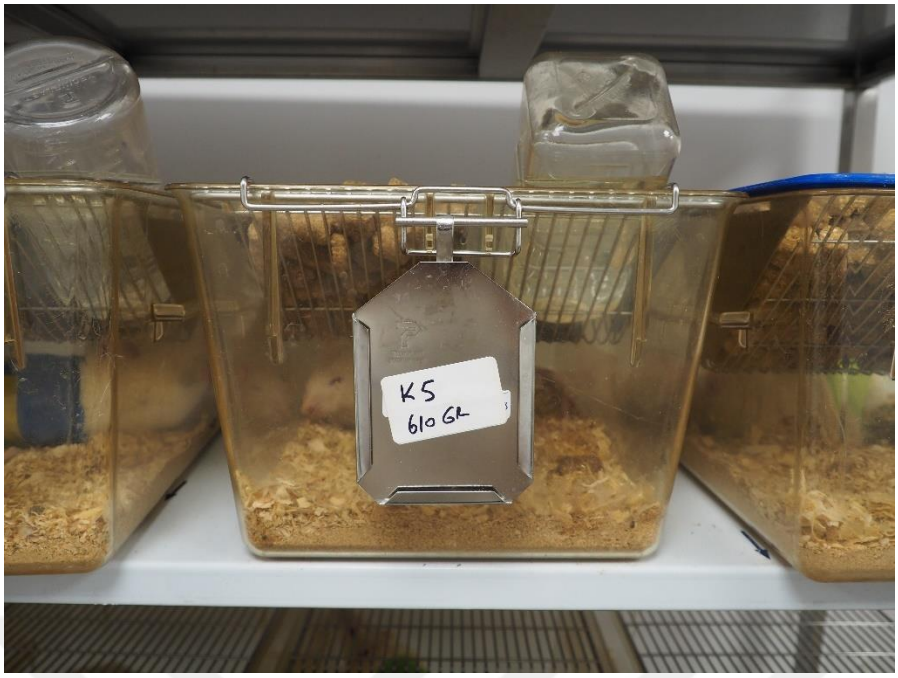
Şekil 60. File pansumanın ön bacak kısmının çıkarılması

Günlük olarak tüm hayvanların pansumanları kontrol edildi. Pansuman değişimleri sağlandı. Hayvanların flep alanlarına ve kendilerine zarar vermediği teyit edildi. 4 hayvan, flep alanlarını kemirip zarar verdiklerinden dolayı çalışmadan çıkarıldı (Şekil 60) ve yerlerine aynı özellikte hayvanlar dahil edildi.



Şekil 61. Postoperatif takipte flep alanlarına zarar veren hayvanlar

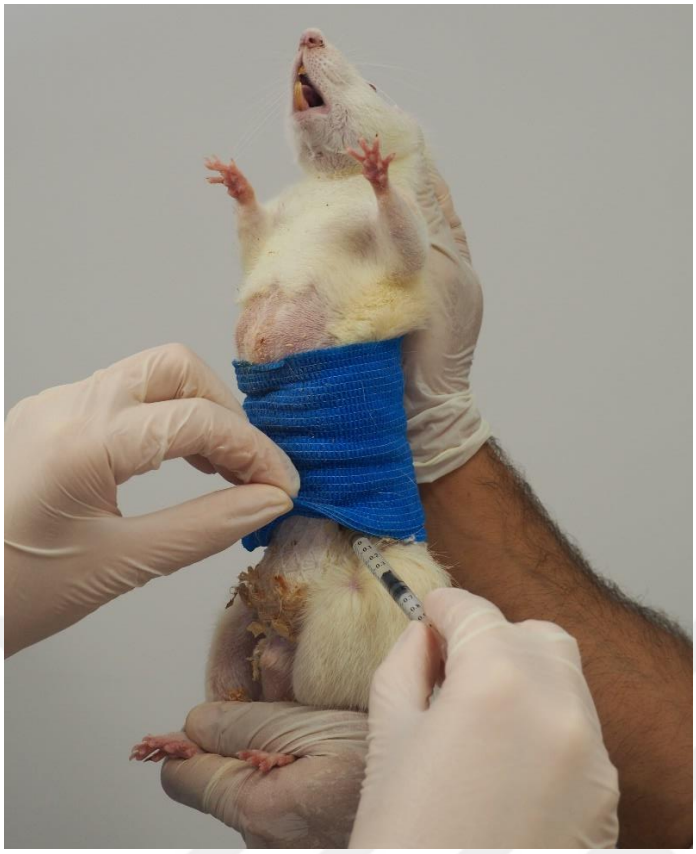
Postoperatif dönemde her hayvan tekli kafese alındı (Şekil 61). Preoperatif dönemde olduğu gibi, 21-22℃ oda sıcaklığında, 12 saat gündüz, 12 saat gece fotoperiyodunda, %18-%20 protein içeren pellet sıçan yemi kullanılarak takip edildi.



Şekil 62. Postoperatif dönemde hayvanların tekli kafeslerde takip edilmesi

3.6. Postoperatif dönemde enjeksiyonların devamı

Postoperatif dönemde, postoperatif 7. Güne dek i.p. enjeksiyonlara devam edildi. Her hayvan enjeksiyon öncesi tartıldı. Tartısına uygun olarak, daha önce anlatıldığı üzere, antioksidanların hazırlığı yapıldı. Grup 3,4 ve 5'e Vitamin C 200mg/kg Vitamin E 40mg/kg ve melatonin 10mg/kg dozlarında enjekte edildi. Grup 1 ve 2'ye ise toplamda aynı hacimde SF enjeksiyonu yapıldı. Tüm enjeksiyonlar, preoperatif dönemde olduğu gibi, sol abdominal bölgeye koban bandajın hemen altından yapıldı (Şekil 62).

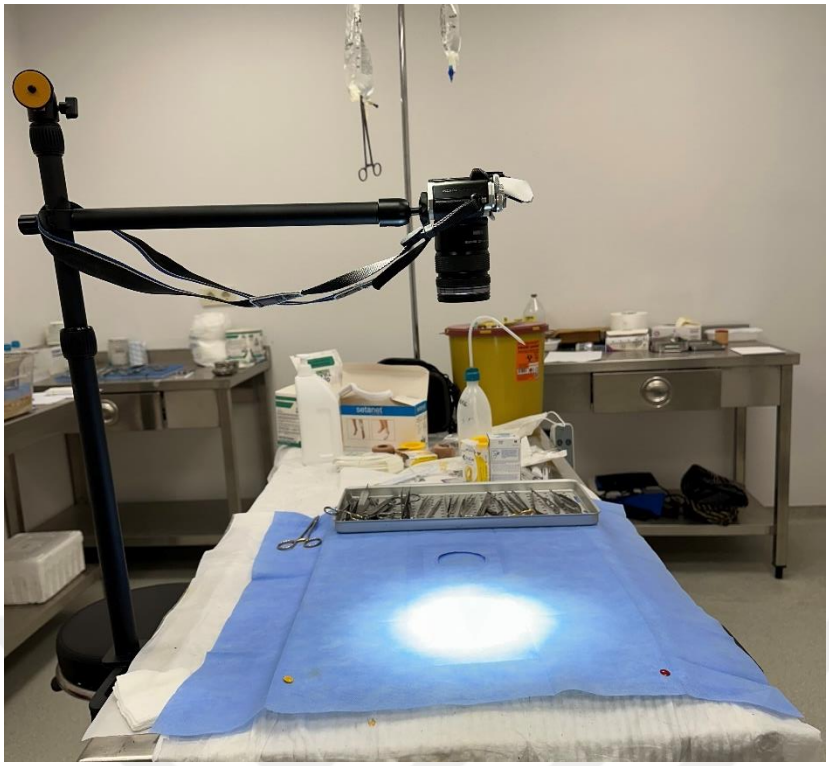


Şekil 63. Postoperatif dönemde i.p. enjeksiyonlara devam edilmesi

3.7. Fotoğrafik verilerin elde edilmesi

Postoperatif 7. günde, hayvanlar sakrifikasyon öncesi Ketamin 75 mg/kg ve ksilazin 8 mg/kg dozunda anestezik ajan uygulanarak anesteziye alındı. Pansumanlar çıkarıldı. Islak gazlı bez ile flep alanları silindi. Flep nekroz alanları ile canlı flep dokusu arasındaki geçişin gözlenmesi sağlandı.

Operasyon masasına sabitlenen tripoda dijital fotoğraf makinesi (Olympus Digital E-M10 II, 12-50 mm Makro Lens) adapte edildi (Şekil 63). Böylece standart mesafeden, standart flaş, uzaklık ve yakınlaştırma ayarları ile flep alanlarının fotoğraf çekimi sağlandı. Fotoğraf çekimi sırasında, alan hesaplamasında yararlanmak için, cerrahi cetvel yerleştirildi (Şekil 64). Ayrıca, tüm hayvanların numaralandırması ile ilgili belirteçler fotoğraf çekimine dahil edildi.



Şekil 64. Standart fotoğraf çekimi için sağlanan düzenek

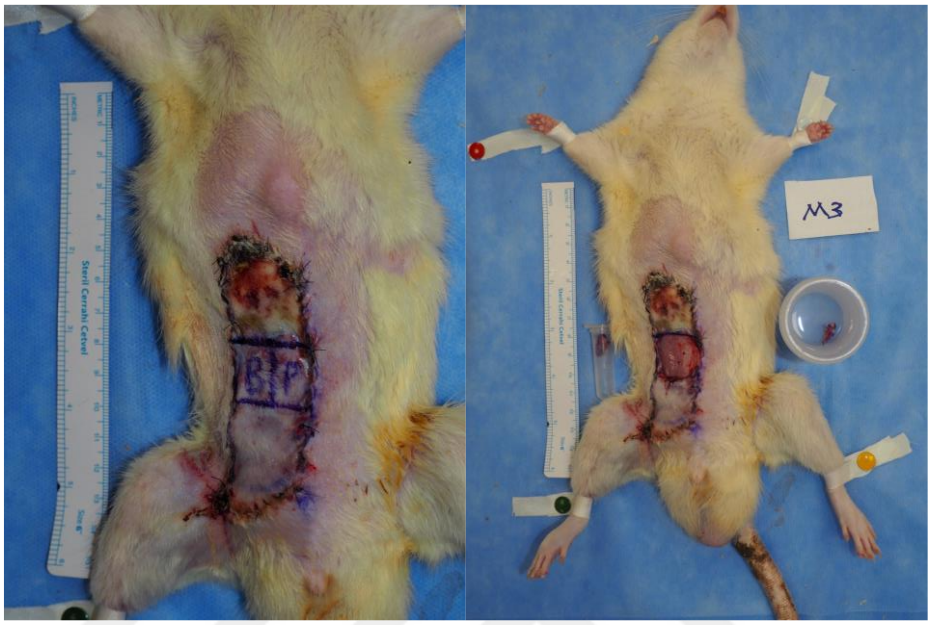


Şekil 65. Ötenazi öncesi standart fotoğraf çekimi

3.8. Doku biyopsilerinin alınması

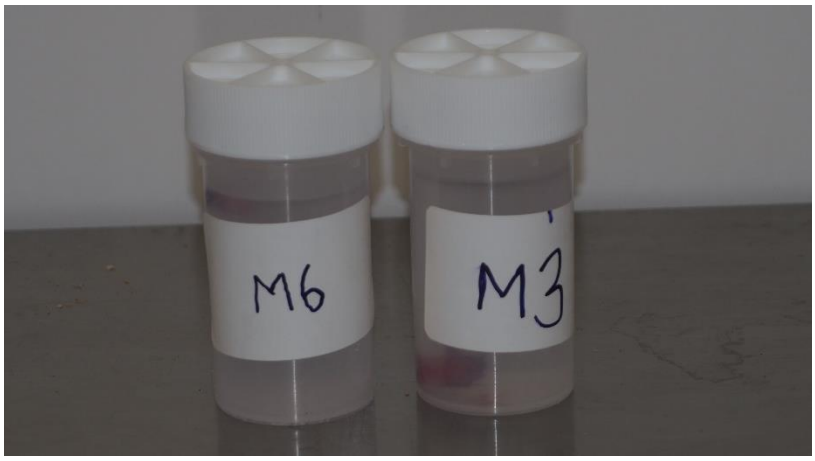
Fotoğraf çekimin ardından doku biyopsilerinin alınması işlemine geçildi. Hayvanların flepleri gözlendi. Flep nekrozu ile canlı flep dokusu arasındaki transizyon

alanı işaretlendi. Transizyon alanının hemen proksimalinden her ikisi 1*1.5 cm'er olmak üzere, medialden histopatolojik inceleme için, lateralden biyokimyasal inceleme için tam kat doku örnekleri alındı (Şekil 65). Tüm örneklerin kaplarına ve tüplerine ilgili hayvanların numaraları etiketler yardımı ile yazıldı ve tasnif edildi



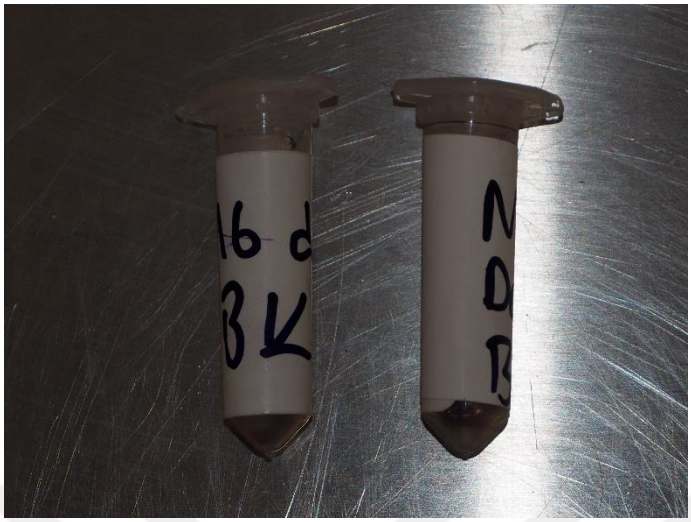
Şekil 66. Transizyon alanının hemen proksimalinden, medialden histopatoloji örneğinin, lateralden biyokimya örneğinin alınması

Alınan histopatoloji örnekleri, %10 formalin solüsyon içeren patoloji kaplarına (Histopot %10 formalin Solüsyon) koyuldu (Şekil 66). Transferleri ilgili kaplar içerisinde sağlandı.



Şekil 67. Doku örneklerinin %10 formalin solüsyon içeren kaplarda saklanması

Alınan doku biyokimya örnekleri ise eppendorf tüplerinin içine koyuldu (Şekil 67). Ardından, ilgili tüpler ivedilikle -80 derecede muhafaza edildi.



Şekil 68. Doku örneklerinin eppendorf tüplere koyulması

3.9. Hayvanların sakrifikasyonu ve intrakardiyak kan alımı

Doku örneklerinin alınmasından sonra intrakardiyak kan alımı işlemine geçildi. Kalp pulsasyonu palpe edildi. Sol aksiller ön çizgi hizasından, kostalar arasından, 22 Gauge iğne uçlu 2cc'lik enjektörler ile girildi (Şekil 68). İlk aspire edilen 2ml kan TAC ölçümü için kırmızı kapaklı biyokimya tüplerine aktarıldı. Ardından yüksek hacimde intrakardiyak kan alımı gerçekleştirilerek ötenazi sağlandı.



Şekil 69. İntrakardiyak kan alımı

Tıpkı postoperatif 24. Saatte kuyruk veninden alınan kan örneklerinde yapıldığı gibi, intrakardiyak alınan kan örnekleri de kırmızı kapaklı biyokimya tüplerinde yarım saat bekletildi. Sonrasıda 3000rpm ile 10 dakika santrifüj edildi. Elde edilen serumlar, pipet yardımı ile eppendorf tüplerine akarıldı. Tüm eppendorf tüplerine ilgili hayvana ait numaralar etiketlendi. Eppendorf tüpleri ivedilikle -80 derecede muhafaza edildi.

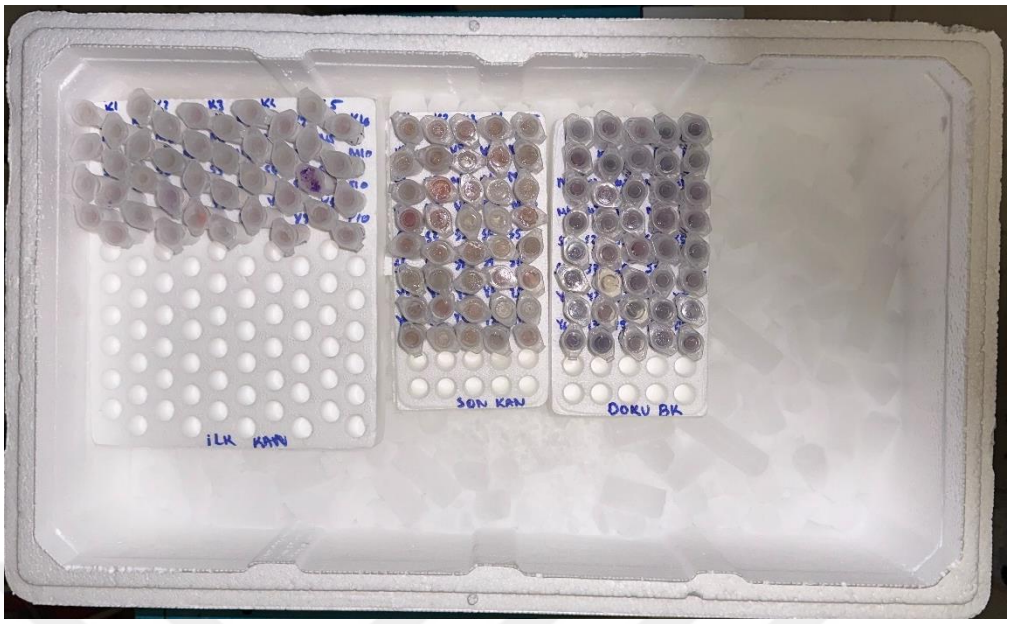
3.10. Elde edilen örneklerin saklanması ve transferi

Histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler için alınan doku biyopsi örnekleri %10 formalin solüsyon içeren patoloji kaplarına (Histopot %10 formalin Solüsyon) alındı ve transferi bu kaplar içerisinde gerçekleştirildi.

Postoperatif 24. Saatte kuyruk veninden elde edilen kan serumları, ötenazi öncesi intrakardiyak alınan kan serumları ve biyokimyasal inceleme için ayrılan doku biyopsi örnekleri transferleri sağlanana kadar eppendorf tüpleri içerisinde -80 derecede muhafaza edildi (Şekil 69). Transferleri sırasında ise, ilgili tüpler tasnif edilerek, içine kuru buz doldurulan köpük kolinin içine yerleştirildi (Şekil 70). Böylece örneklerin transfer sırasında ısınması önlendi.



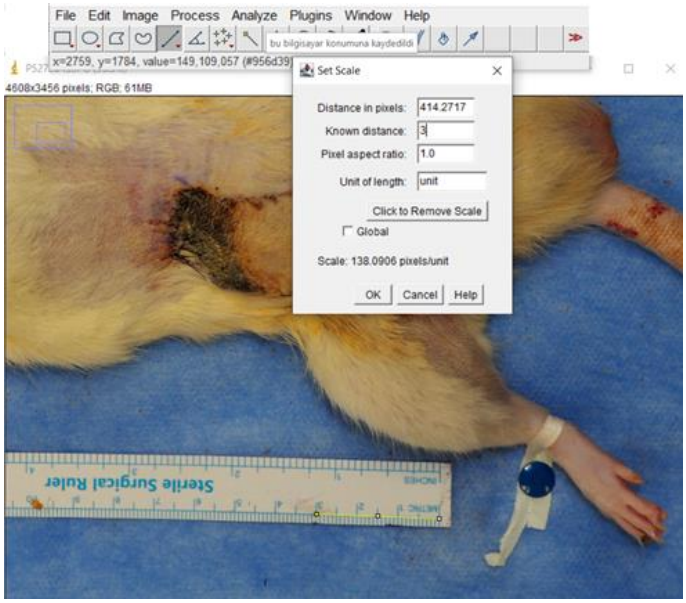
Şekil 70. Örneklerin -80 derecede saklanmasını sağlayan soğutucu



Şekil 71. Biyokimya örneklerinin tasnifi ve kuru buz içerisinde transferi

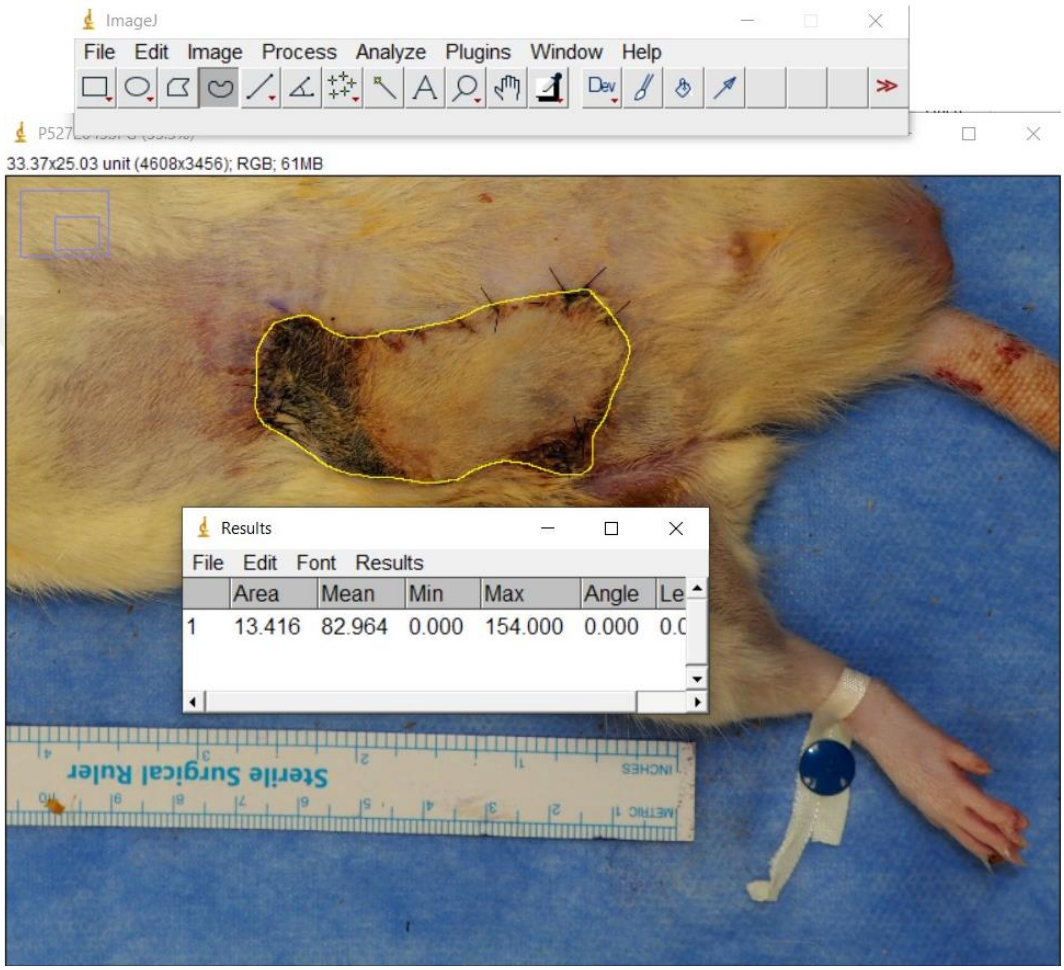
3.11. Fotoğrafik Değerlendirme

Ötenazi öncesinde elde edilen flep alanlarının dijital fotoğrafları bilgisayar ortamına aktarıldı. Fleplerin toplam alanlarını ve nekrotik alanlarını hesaplamak amacıyla Image J isimli bilgisayar programı kullanıldı. Tüm fotoğraflarda yer alan medikal cetvel sayesinde tüm hesaplamalar öncesinde piksel referansı alınabildi (Şekil 71). Her fotoğrafta 3cm'lik uzunluk için piksel referansı alındı.

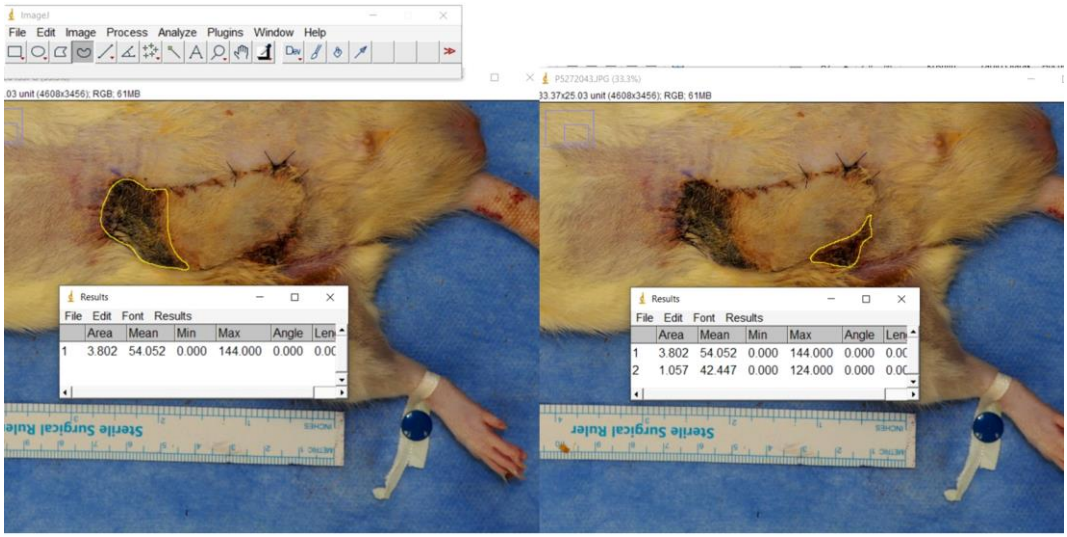


Şekil 72. Image J programında piksel referansının alınması

Piksel referansı alındıktan sonra tüm flep alanı, flep çevresinden çizim yapılarak hesaplandı (Şekil 72). Ardından nekrotik alanlar aynı yöntemle hesaplandı. Eğer birbirinden bağımsız nekroz adacıkları mevcutsa, ilgili alanlar ayrı ayrı hesaplandı ve sonrasında birbiriyle toplandı (Şekil 73). Sonuç olarak, toplam nekroz alanı, flep alanına bölünerek nekroz yüzdesi elde edildi.



Şekil 73. Toplam flep alanının hesaplanması

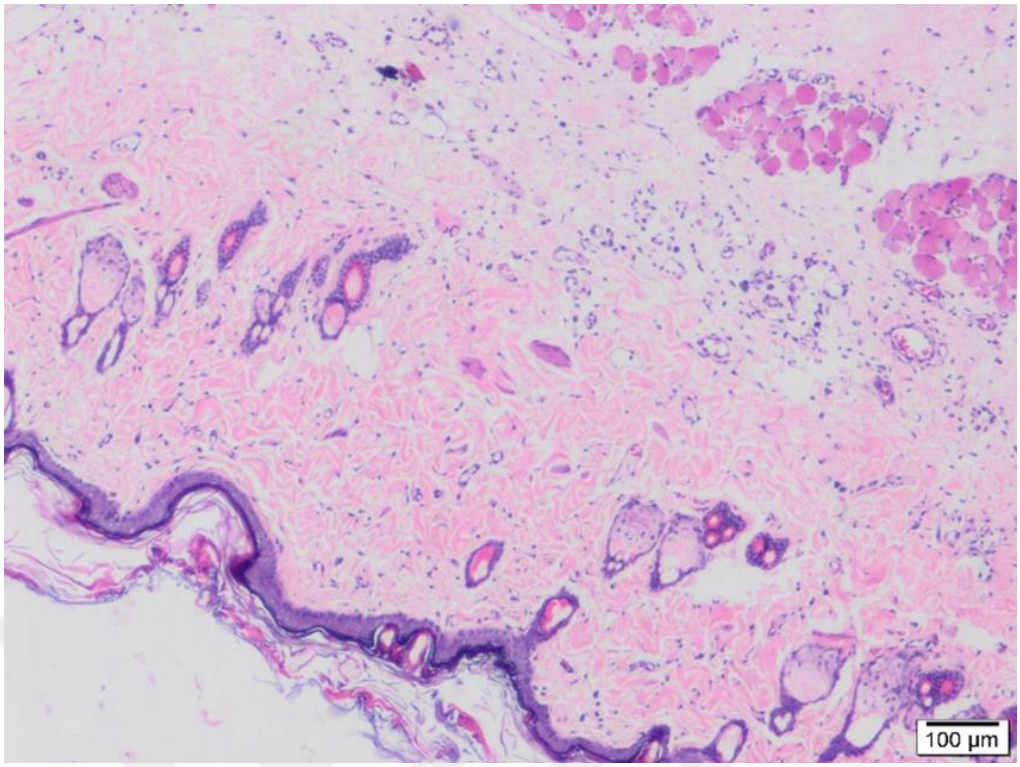


Şekil 74. Nekroz alanlarının ayrı ayrı hesaplanması

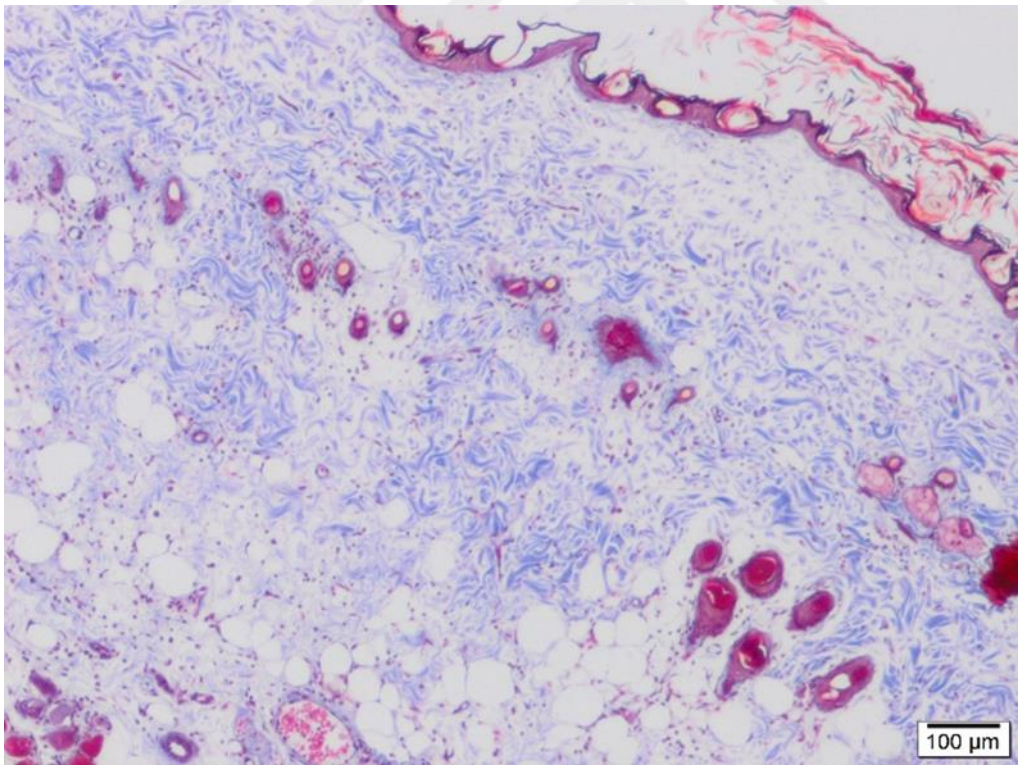
3.12. Histopatolojik değerlendirme

Ötenazi öncesinde, nekrotik doku ile sağlıklı flep dokusu arasındaki geçiş bölgesinden 1,5x1 cm boyutlarında tam kat doku örnekleri alınıp, nötr tamponlu formalin ile fikse edildi ve parafine gömüldü. Mikron boyutundaki kesitler deparafinize edilerek Hematoksilin-Eozin (HE) ve Mason Trikrom (MT) boyamaları ile işlendi. Histolojik incelemeler Nikon Eclipse E400 ışık mikroskobu kullanılarak yapıldı ve dijital görüntüler, ışık mikroskobuna entegre edilmiş Nikon Coolpix 5000 dijital kamera ile kaydedildi. Histolojik değerlendirmeler gruplar arasında kör olarak gerçekleştirildi. Doku örneklerinin nötrofil yoğunluğu, damarlamanın azlığı, kollajen yapısı ve yoğunluğu deneyimli bir patolog tarafından, fleplerin hangi gruba ait olduğu bilinmeksizin, +1 (en az) ile +5 (en fazla) arasında bir skorlama sistemi ile değerlendirildi (19).

HE boyama (Şekil 74) ile nötrofil yoğunluğu ve damarlanmanın azlığı skorlanırken, MT boyama (Şekil 75) ile ise kollajen yapısı ve yoğunluğu skorlandı.

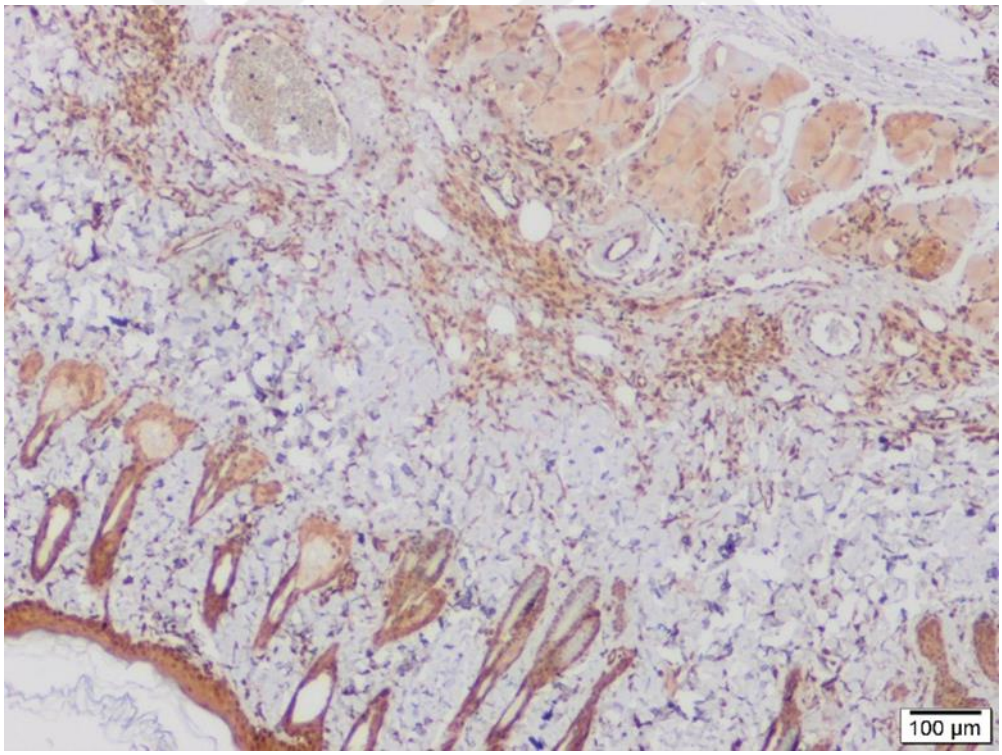


Şekil 75. Doku örneğinin hematoksilen ve eozin ile boyama kesiti



Şekil 76. Doku örneğinin Mason Trikrom ile boyanması ve mavi boyanan kollajen yapısı

İndirekt immünohistokimya yöntemiyle yapılan analizde, deparafinizasyon ve antijen geri kazanımı sonrası kesitler, pH 7.4'e ayarlanmış Twin Tampon Çözeltisi (TBST) içerisinde 15 dakika bekletildi ve ardından TBST ile yıkandı. Nonspesifik bağlanmaların önüne geçmek amacıyla %1 hidrojen peroksit (Lab Vision, Thermo Scientific, Fremont, ABD) 10 dakika boyunca uygulandı. Bloklama aşamasının ardından, primer antikorlar eNOS, VEGF, Kaspaz-3 ve IL1b (Boster Bio PA2140-2) 1:100 oranında seyreltilerek doku kesitlerine uygulandı. Kesitler, primer antikorlarla gece boyunca +4°C'de inkübe edildi. Sonraki adımda, kesitler biyotinle işaretlenmiş sekonder antikor (Lab Vision, Thermo Scientific) ile oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi ve ardından streptavidin peroksidaz enzimi (Lab Vision, Thermo Scientific) ile 20 dakika süreyle reaksiyona sokuldu. Kesitler TBST ile yıkandıktan sonra, diaminobenzidin içeren kromojen substrat ile oda sıcaklığında 5-10 dakika inkübe edilerek renk reaksiyonu geliştirildi. Son aşamada, kesitler Mayer hematoksilin ile zıt boyama işlemine tabi tutuldu (Şekil 76).



Şekil 77. İmmünhistokimyasal boyamaya ait kesit

İmmünohistokimya boyamalarının yarı-kantitatif sonuçları, H-skoru yöntemi ile değerlendirildi. Boyanma sıfır ile dört arası skorlandı. Boyama skorlaması, 0 puan hiç boyanma olmadığı durumu ifade ederken; +1, yalnızca yüksek büyütmede görülebilen hafif boyanmayı; +2, orta düzeyde boyanmayı; ve +3, düşük büyütmede

dahi net bir şekilde görülebilen yoğun boyanmayı gösterdi. Farklı boyanma yoğunluklarına sahip hücrelerin yüzdesi görsel olarak belirlendi ve skor, şu formül kullanılarak hesaplandı: 1 × (% +1 hücre) + 2 × (% +2 hücre) + 3 × (% +3 hücre). Görüntüler, Olympus BX-40 ışık mikroskobuna (Olympus Optical Co. Ltd., Tokyo, Japonya) sabitlenmiş renkli bir video kamera (Panasonic Renkli CCTV kamera, Matsushita Communication, Industrial Co. Ltd., Tokyo, Japonya) kullanılarak çekildi.

3.13. Biyokimyasal değerlendirme

Postoperatif 24. Saatte kuyruk veninden alınan kandan elde edilen serumlar, ötenazi öncesi intrakardiyak olarak alınan kandan elde edilen serumlar ve ötenazi öncesi alınan 1,5*1 cm^2'lik tam kat doku biyopsileri biyokimyasal olarak incelendi. Serum örneklerinde TAC, doku örneklerinde AOPP, GSH, MDA, MPO ve SOD düzeyleri ELISA yöntemi ile uygun kitleri sayesinde araştırıldı (sırasıyla ELABSCİENCE Cat.No:E-BC-K801-M, SUNRED DZE SRB-T-88141, DZE201117122, DZE201110157, DZE SRB-T-83049, DZE201110169)

Serum örneklerinin TAC ölçümleri, Re ve ark. yöntemine göre Trolox Eşdeğer Antioksidan Kapasitesi (TEAC) testi kullanılarak gerçekleştirildi (158). E-BC-K801-M Kromatografik Test Kiti kullanıldı ve renk değişimi 660 nm'de ölçüldü. Antioksidan kapasite için referans standart olarak Trolox kullanıldı.

Doku örneklerinde biyokimyasal inceleme yapılabilmesi için, doku biyopsileri homojenizasyon işleminden önce elektronik bıçak yardımıyla 0,2 gramlık parçalar halinde kesildi. Bu parçalar, 1 mL fosfat tamponu (pH: 7,2) içerisinde 5 dakika süreyle homojenize edildi. Homojenize edilen doku örnekleri polipropilen tüplere aktarıldıktan sonra, 5000 devirde 10 dakika süreyle santrifüj edildi. Santrifüj sonrasında elde edilen süpernatantlar, biyokimyasal analizlerde kullanılmak üzere ayrıldı. Ardından, Her bir reaktif için ayrı stok standart çözeltileri hazırlandı ve bu çözeltiler kullanılarak 64 ng/mL, 32 ng/mL, 16 ng/mL, 8 ng/mL ve 4 ng/mL konsantrasyonlarında standartlar elde edildi. Uygun kuyucuklara 50 µL standart çözeltileri eklendi. Standart çözeltiler biyotinle işaretlenmiş antikor içerdiği için bu kuyucuklara ayrıca antikor eklenmedi. Numune örnekleri 40 µL hacminde kuyucuklara yerleştirildi ve her bir numune kuyucuğuna 10 µL antikor eklendi. Ardından, tüm standart ve numune kuyucuklarına 50 µL streptavidin-HRP eklendi, kuyucuklar kapatılarak 37 ºC'de 60 dakika süreyle inkübe edildi. Daha sonra, ELISA

yıkayıcısı ile 350 µL hacminde yıkama solüsyonu kullanılarak kuyucuklar 5 kez yıkandı. Her bir kuyucuğa 50 µL kromojen A eklendi ve ardından kromojen B ilave edilerek kuyucuklar karanlık bir ortamda 37 ºC'de 10 dakika inkübe edildi. Son olarak, her kuyucuğa 50 µL durdurma solüsyonu eklendi ve reaksiyon sonucunda renk maviden sarıya döndü. Absorbans değerleri, 450 nm dalga boyuna sahip bir mikroplaka okuyucu ile 15 dakika içerisinde okundu. Elde edilen konsantrasyon verileri kaydedildi. Sonrasında Lowry yöntemine (159) uygun olarak protein konsantrasyonları ölçüldü. ELISA kitlerinden elde edilen veriler protein konsantrasyonlarına bölünerek MDA ve AOPP için nmol/mg protein, MPO, GSH ve SOD için ng/mg protein birimlerinde sonuçlar elde edilmiştir.

3.14. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeye, fotoğrafik verilerin incelenmesi ile başlandı. İlk olarak, fleplerin total alanlarının her grupta normal bir dağılıma sahip olup olmadığı araştırıldı. Bunun için, Shapiro-Wilk testi kullanıldı. Normal dağılımı sağlayan ($p > 0.05$) ve sağlamayan ($p < 0.05$) gruplar belirlendi. Normal dağılım sağlandığı teyit edilen gruplarda istatistiksel değerlendirmeye devam edildi.

Gruplar hem toplam flep alanları hem de nekroz alanı/toplam flep alanları (nekroz oranları) için istatistiksel anlamlılık açısından tek yönlü varyans analizi (ANOVA) testine tabi tutuldu. Anlamlılık düzeyi olarak $p \leq 0,05$ kabul edildi. ANOVA testi öncesinde gruplara, varyans homojenitesi açısından Levene testi uygulandı. $p < 0.05$ bulunması halinde homojenite düzeltilmesi için Brown-Forsythe testi kullanıldı. Bunların ardından, gruplar arasında çoklu karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi uygulandı.

Histopatolojik verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, veriler ortalama ± standart sapma (SD) formatında sunuldu. İstatistiksel değerlendirme ANOVA yöntemi ile yapıldı ve çoklu karşılaştırmalar için Tukey post hoc testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p \leq 0,05$ kabul edildi.

Serumdan çalışılan postoperatif 24. saatteki ve ötenazi öncesindeki TAC düzeylerinin, gruplar arasında, değerlendirilmesinde tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p \leq 0,05$ kabul edildi. Varyans homojenitesi değerlendirildi. $p < 0.05$ bulunması halinde homojenite düzeltilmesi için Brown-Forsythe testi kullanıldı. Gruplar arası çoklu karşılaştırma için de Tukey post hoc testi

uygulandı. Grupların kendi içerisindeki ilk ve son kandaki TAC düzeyleri arasındaki farkın değerlendirilmesi için ise, her gruba bağımlı örneklem t testi uygulandı. Bu test öncesi her gruba Shapiro Wilk testi uygulanarak normal dağılım olup olmadığı test edildi. Normal dağılım sağlandığı gözlendiyse bağımlı örneklem t testine devam edildi. Eğer normal dağılım yoksa, bağımlı örneklem t testi yerine Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı.

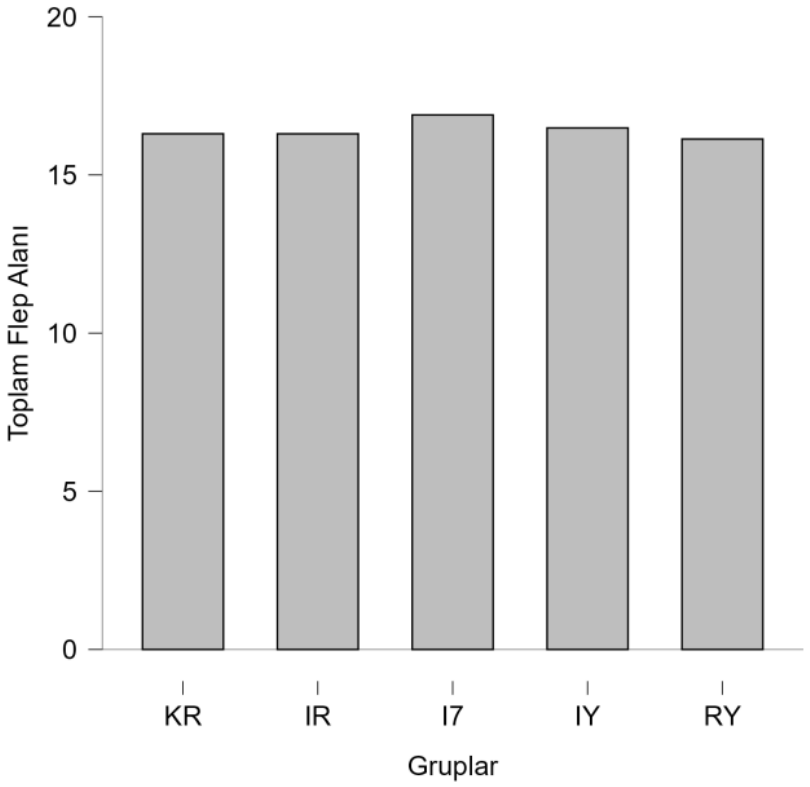
Biyokimyasal verilerin değerlendirilmesinde de tek yönlü ANOVA testi kullanıldı. Anlamlılık düzeyi olarak $p \leq 0,05$ kabul edildi. Varyans homojenitesi değerlendirildi. $p < 0.05$ bulunması halinde homojenite düzeltilmesi için Brown-Forsythe testi kullanıldı. Gruplar arası çoklu karşılaştırma için de Tukey post hoc testi uygulandı.

Tüm verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, JASP (Version 0.19.1) programı kullanıldı.

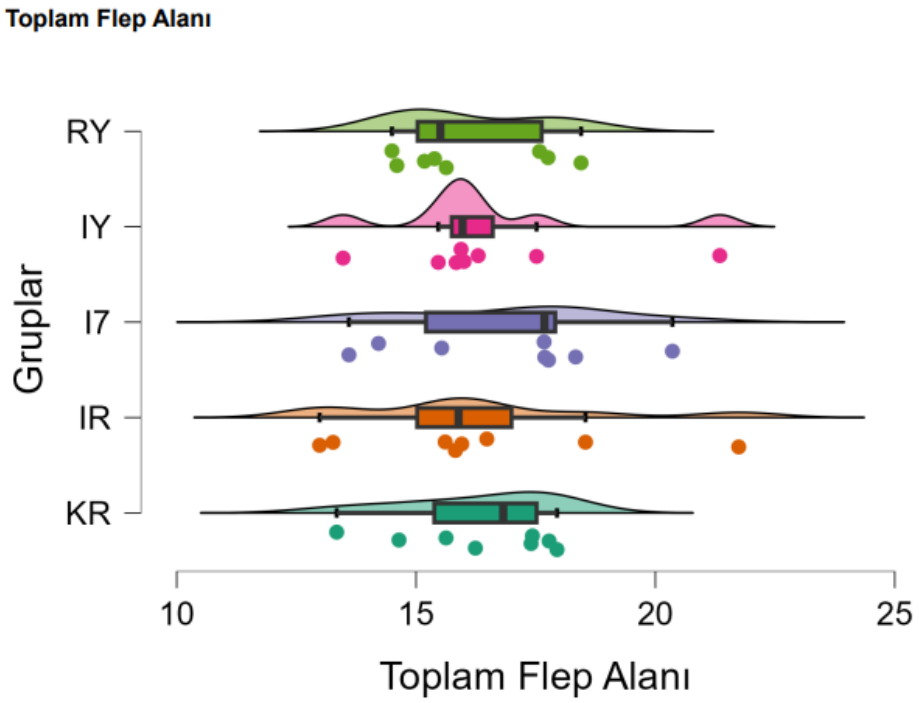
4. BULGULAR

4.1. Fotoğrafik İnceleme Bulguları

Ötenazi öncesinde elde edilen fotoğraflar üzerinde yapılan çalışmalarda, toplam flep alanları cm^2 birimi üzerinden hesaplandı. Toplam flep alanlarının ortalamaları; KR grubu için 16,30 cm^2, İR grubu için 16,30 cm^2, İ7 grubu için 16,90 cm^2, İY grubu için 16,49 cm^2, RY grubu için ise 16,13 cm^2 olarak hesaplandı (Grafik 1). KR grubunda en yüksek alan 17,95 cm^2 en düşük alan 13,34 cm^2, İR grubunda en yüksek alan 21,74 cm^2 en düşük alan 12,99 cm^2, İ7 grubunda en yüksek alan 20,36 cm^2 en düşük alan 13,56 cm^2, İY grubunda en yüksek alan 21,35 cm^2 en düşün alan 13,48 cm^2, RY grubunda en yüksek alan 18,45 cm^2 en düşük alan 14,50 cm^2 olarak bulundu. Gruplara göre alan dağılımları Grafik 2'de verildi.



Grafik 1. Gruplara göre toplam flep alanı ortalamaları



Grafik 2. Gruplara göre toplam flep alanı dağılımı

Tüm gruplarda toplam flep alanlarının normal dağılıma sahip olup olmadığını incelemek amacıyla Shapiro-Wilk testi uygulandı. İlgili testte, tüm grupların p değeri 0,05 üzeri saptandığından dolayı, normal dağılım olduğu teyit edildi (Tablo 2).

Tablo 2. Shapiro Wilk Testi ile Toplam Flep Alanlarının Değerlendirilmesi

Gruplar	Değer	Medyan	Shapiro-Wilk	p değeri
KR	8	16,30	0.894	0.256
İR	8	16.30	0.912	0.369
İ7	8	16,90	0.930	0.521
İY	8	16,49	0.844	0.083
RY	8	16,13	0.868	0.144

Ardından, tüm grupların toplam flep alanlarının varyans homojenitesi açısından Levene Testi uygulandı (Tablo 3). İlgili testte, p değeri 0,810 olarak hesaplandı. Varyansların homojen olduğu kanısı getirildi. Böylece homojenite düzeltilmesine gerek kalmadı.

Tablo 3. Levene Testi- Toplam flep alanları

Varyans eşitliği testi (Levene)			
F	**df1**	**df2**	**p**
3.826	4	35	0.810

Tek yönlü ANOVA testinde (Tablo 4) ve gruplar arasında çoklu olarak yapılan karşılaştırmada (pos hoc Tukey testi, Tablo 5) toplam flep alanları açısından gruplar arası istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmadı. ANOVA testinde p değeri 0,96 olarak hesaplandı.

Tablo 4. ANOVA Testi – Toplam Flep Alanı

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
ANOVA	Gruplar	2.731	4	0.683	0.146	0.964

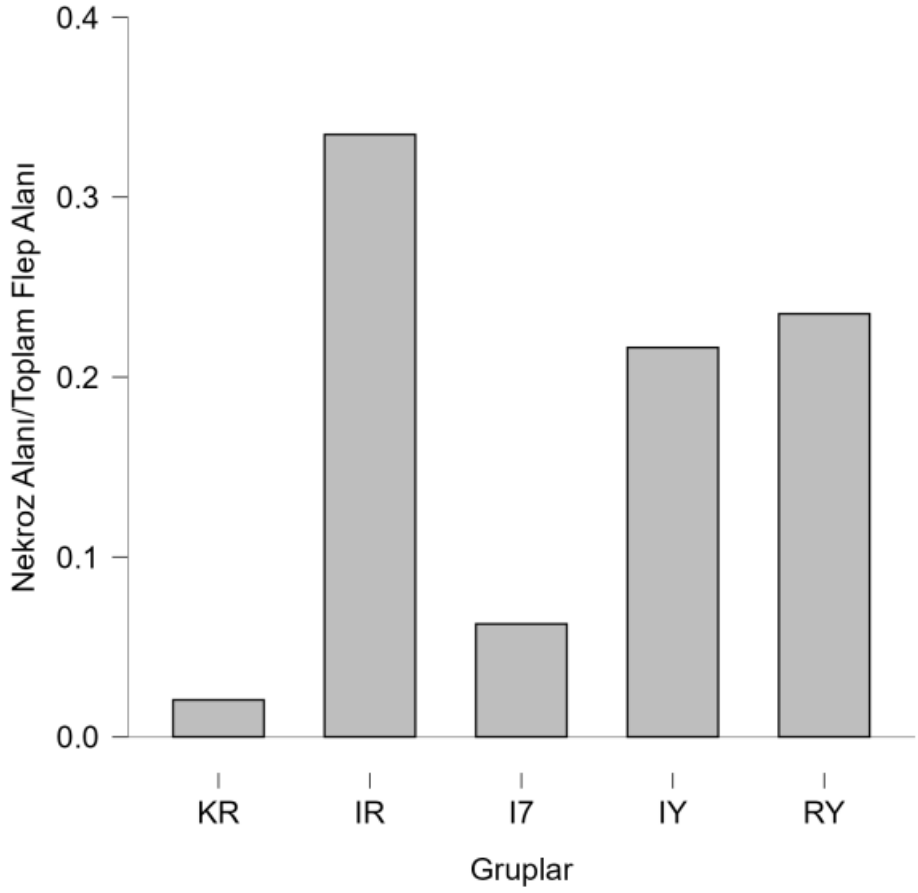
Not. Tip III Kareler toplamı

Tablo 5. Gruplar arası çoklu karşılaştırma – Toplam flep alanları

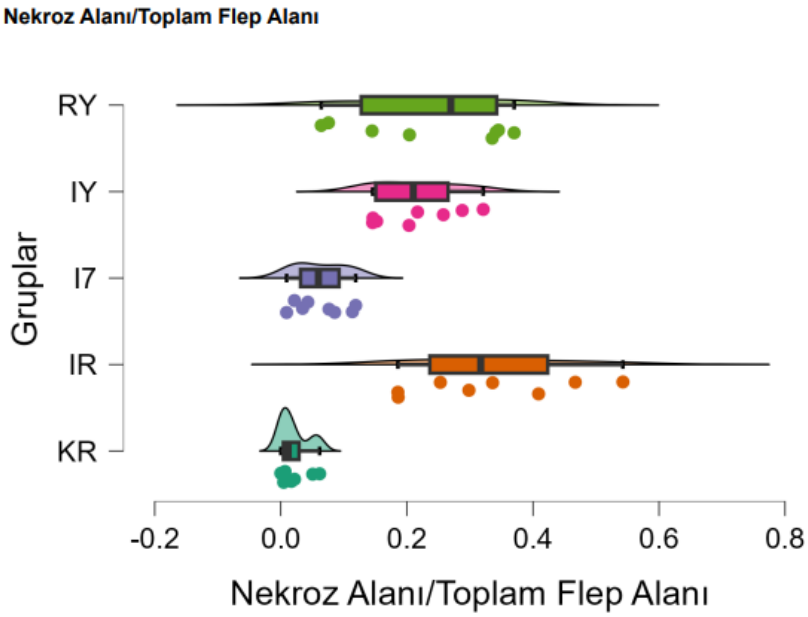
Tukey Post Hoc karşılaştırma

Karşılaştırma	Ortalama fark	95% güven aralığında ortalama fark		SE	t	p_{tukey}
		Alt	Üst			
KR - İR	0.002	−3.106	3.109	1.081	0.002	1.000
KR-İ7	−0.595	−3.703	2.513	1.081	−0.550	0.981
KR-İY	−0.184	−3.292	2.923	1.081	−0.170	1.000
KR-RY	0.167	−2.940	3.275	1.081	0.155	1.000
İR-İ7	−0.597	−3.704	2.511	1.081	−0.552	0.981
İR-İY	−0.186	−3.293	2.922	1.081	−0.172	1.000
İR-RY	0.166	−2.942	3.273	1.081	0.153	1.000
İ7-İY	0.411	−2.697	3.518	1.081	0.380	0.995
İ7-RY	0.762	−2.345	3.870	1.081	0.705	0.954
İY-RY	0.351	−2.756	3.459	1.081	0.325	0.997

Bir sonraki aşamada, her hayvana ait nekroz alanları toplam flep alanına bölündü. Böylece nekroz oranları hesaplandı. Bu oranların ortalamaları ; KR grubunda %2,1, İR grubunda %33,5, İ7 grubunda %6,3, İY grubunda %21,6 ve RY grubunda %23,5 olarak bulundu. Nekroz oranları ; KR grubunda en yüksek %6,2 en düşük %0, İR grubunda en yüksek %54,3 en düşük %18,6, İ7 grubunda en yüksek %11,9 en düşük %0,9, İY grubunda en yüksek %32,1 en düşük %14,6 ve RY grubunda en yüksek %37 en düşük %6,4 olarak hesaplandı. Böylece ; iskemi-reperfüzyon uygulanan gruplar arasında en düşük nekroz oranı ortalamasına sahip grubun, İ7 grubu olduğu saptandı. Nekroz oranlarının ortalamaları Grafik 3'te, nekroz oranlarının dağılımları Grafik 4'te, nekroz oranları ve varyansları ise Tablo 6'da verildi.



Grafik 3. Gruplara göre nekroz oranı ortalamaları



Grafik 4. Grafiklere göre nekroz oranı dağılımı

Tablo 6. Nekroz oranları ve varyansları

Tanımlayıcı testler (Nekroz oranları)

Grup	N	Ortalama	SD	SE	Varyasyon katsayısı
KR	8	0.021	0.023	0.008	1.133
İR	8	0.335	0.130	0.046	0.389
İ7	8	0.063	0.042	0.015	0.664
İY	8	0.216	0.068	0.024	0.313
RY	8	0.235	0.128	0.045	0.546

Nekroz oranlarının varyans homojenitesini değerlendirmek için Levene testi yapıldı. İlgili testte, $p < 0.01$ olarak hesaplandı (Tablo 7). Bu nedenle homojenite düzeltme testi olan Brown-Forsythe testi uygulandı.

Tablo 7. Levene Testi – Nekroz Oranları

Varyans eşitliği testi (Levene)

F	df1	df2	p
8.574	4	35	< .001

Brown-Forsythe homojenite düzeltme testinde nekroz oranları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark olduğu saptandı (Tablo 8). p değeri < 0.01 olarak hesaplandı. Sonrasında, gruplar arasında çoklu karşılaştırma için post hoc Tukey testi uygulandı. Bu testte, KR grubunun sadece İ7 grubu ile arasında anlamlı bir farka sahip olmadığı, İ7 grubunun nekroz oranlarının İR, İY ve RY gruplarının nekroz oranlarına göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük olduğu, İR grubu ile İY ve RY grupları arasında anlamlı bir fark olmadığı ve İY ile RY grupları arasında da nekroz oranları açısından anlamlı bir fark olmadığı saptandı. Böylece ; iskemi ve reperfüzyon uygulanan gruplar arasında istatistiksel anlamlı olarak en az nekroz oranına sahip olan grubun İ7 grubu olduğu belirlendi.

Tablo 8. Gruplar arası çoklu karşılaştırma – Nekroz oranları

Post Hoc Tukey Testi

Karşılaştırma		Ortalama fark	95% güven aralığında ortalama fark		p_{tukey}
			Alt	Üst	
KR	İR	−0.314	−0.443	−0.185	< .001**
KR	İ7	−0.042	−0.171	0.087	**0.879**
KR	İY	−0.196	−0.325	−0.067	< .001**
KR	RY	−0.215	−0.344	−0.086	< .001**
İR	İ7	0.272	0.143	0.401	**< .001****
İR	İY	0.118	−0.011	0.247	0.085
İR	RY	0.100	−0.029	0.229	0.196
İ7	İY	−0.154	−0.283	−0.025	**0.013***
İ7	RY	−0.172	−0.301	−0.043	**0.004****
İY	RY	−0.019	−0.148	0.110	0.993

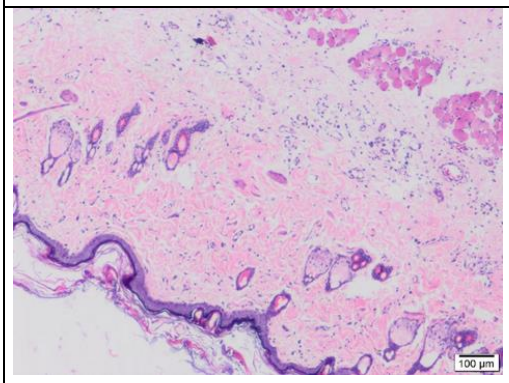
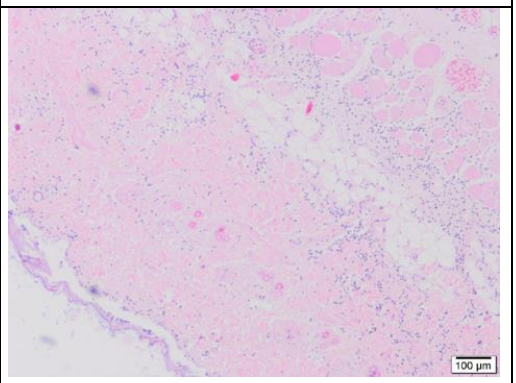
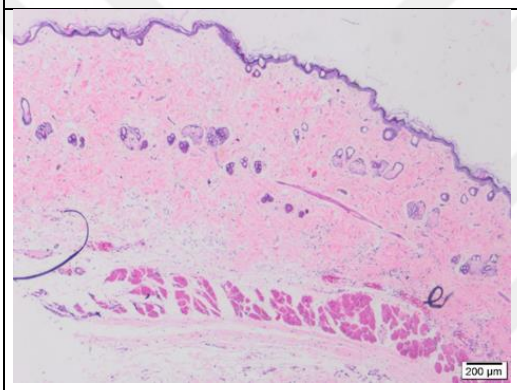
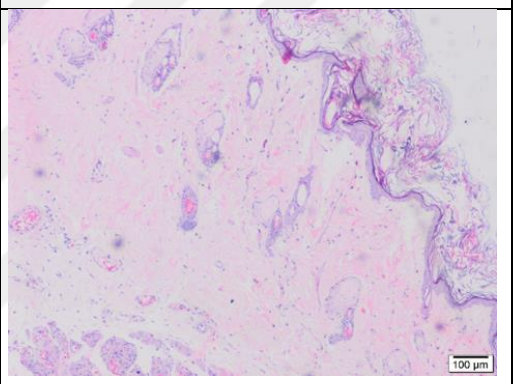
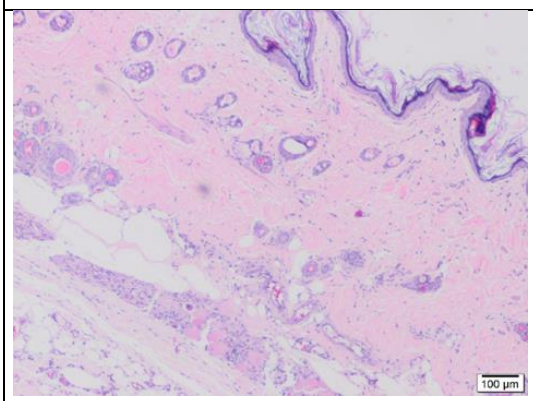
* p < .05, ** p < .01

Not. P-değeri ve güven aralıkları 5'li tahmine göre ayarlanmıştır (güven aralığı düzeltmesinde tukey metodu kullanılmıştır).

4.2. Histopatolojik Değerlendirme Bulguları

Hematoksilen ve eozin boyaması sonrasında, KR ile karşılaştırıldığında İR için ödem, kollajen liflerde bozulma, damarlanmanın azalması izlendi. Ayrıca HE boyamada incelenen tüm histopatolojik parametrelerde (nötrofil yoğunluğu ve damarlanma azlığı) KR ile karşılaştırıldığında İR için artış gözlenirken melatonin, Vitamin E ve C (MEC) uygulamalarının bunları tersine çevirdiği izlendi (Tablo 9).

Tablo 9. Gruplara göre HE boyama kesitleri, x100 büyütme

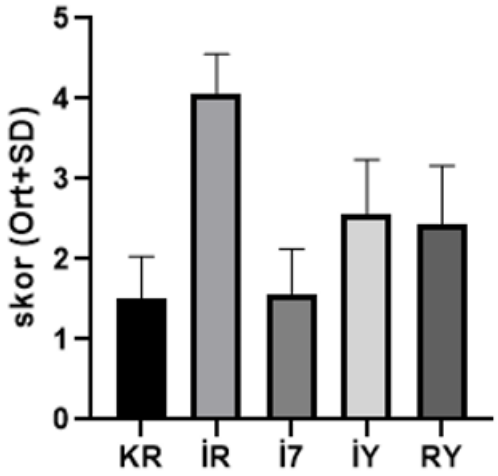
Hematoksilen Eozin	
KR	İR
	
İ7	İY
	
RY	
	

HE boyama sonrası yapılan skorlamada; KR grubunun ortalama skoru 1,5, İR grubunun ortalama skoru 4,063, İ7 grubunun ortalama skoru 1,563, İY grubunun ortalama skoru 2,563 ve RY grubunun ortalama skoru 2,438 olarak hesaplandı. En

yüksek ve en düşük skorlar sırasıyla; KR grubu için 2,5 ve 1, İR grubu için 4,5 ve 3,5, İ7 grubu için 2,5 ve 1, İY grubu için 3,5 ve 1,5, RY grubu için ise 3,5 ve 1,5 olarak bulundu. İlgili sonuçlar Tablo 10 ve Grafik 5'te verildi.

Tablo 10. HE boyama skorlama sonuçları

Grup	**KR**	**İR**	**İ7**	**İY**	**RY**
Sayı	8	8	8	8	8
En düşük skor	1,000	3,500	1,000	1,500	1,500
En yüksek skor	2,500	4,500	2,500	3,500	3,500
Aralık	1,500	1,000	1,500	2,000	2,000
Ortalama	1,500	4,063	1,563	2,563	2,438
Standart Sapma	0,5345	0,4955	0,5630	0,6781	0,7289



Grafik 5. HE boyama skorlama sonuçları

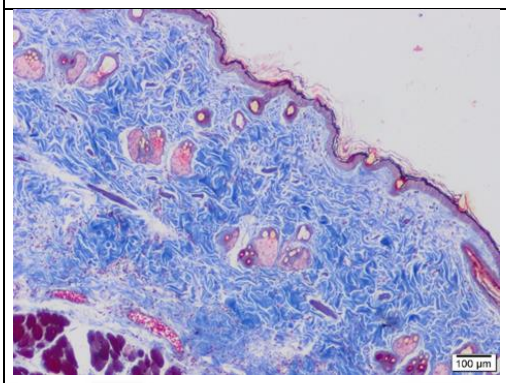
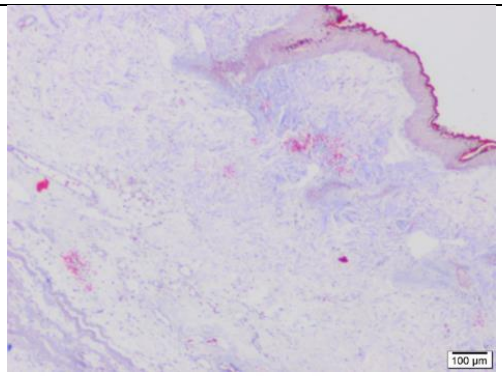
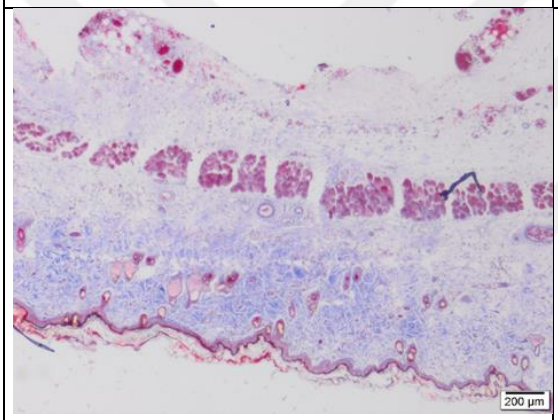
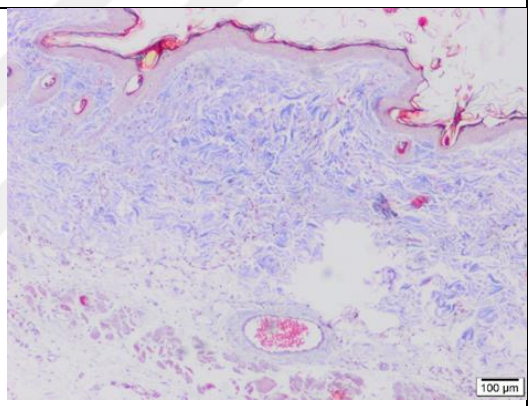
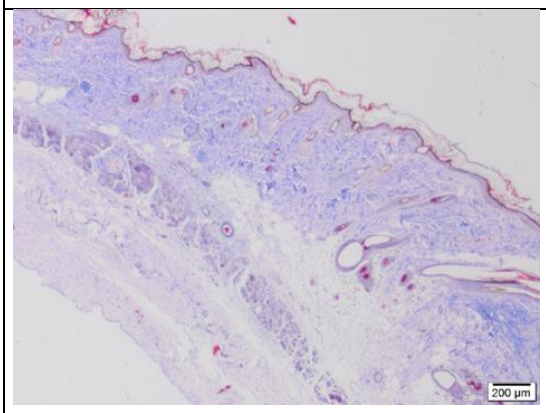
Nötrofil yoğunluğu ve damarlanma azlığı bakımından yapılan skorlamanın istatistiksel değerlendirilmesinde; KR grubu ile sadece İ7 grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,9996). İR grubu ile MEC uygulaması yapılan tüm gruplar karşılaştırıldığında, tüm karşılaştırmalarda MEC uygulanan gruplar lehine istatistiksel olarak anlamlı düşüklük saptandı. MEC uygulanan gruplar arasındaki karşılaştırmada ise; İ7 grubu ile İY ve RY gruplarının karşılaştırmasında istatistiksel olarak İ7 grubu lehine anlamlı düşüklük bulunurken (sırasıyla p=0,0179, p=0,0488), İY ile RY grupları arasında anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,9937). İlgili sonuçlar Tablo 11'de paylaşıldı.

Tablo 11. HE skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Karşılaştırma	Ortalama fark	95,00% Güven aralığında fark	P değeri
KR-İR	-2,563	-3,434'den 1,691	<0,0001
KR-İ7	-0,0625	-0,934'den 0,8094	**0,9996**
KR-İY	-1,063	-1,934'den 0,1906	0,0105
KR-RY	-0,9375	-1,809'tan -0,06562	0,0299
İR- İ7	2,500	1,628'den 3,372	**<0,0001**
İR-İY	1,500	0,628'den 2,372	**0,0002**
İR-RY	1,625	0,7531'den 2,497	**<0,0001**
İ7-İY	-1,000	-1,872'den 0,1281	**0,0179**
İ7-RY	-0,8750	-1,747'den -0,00312	**0,0488**
İY-RY	0,1250	-0,7469'dan 0,9969	0,9937

MT boyaması sonrası kollajen yoğunluğu ve yapısı skorlandı. MT boyamalarında KR ile karşılaştırıldığında İR için kollajen liflerde yapısal ve konfigirasyon bozulmaları izlendi. Buna karşılık, MEC uygulamalarının bu bozulmaları tersine çevirdiği saptandı (Tablo 12).

Tablo 12. Gruplara göre MS boyama kesitleri, x100 büyütme

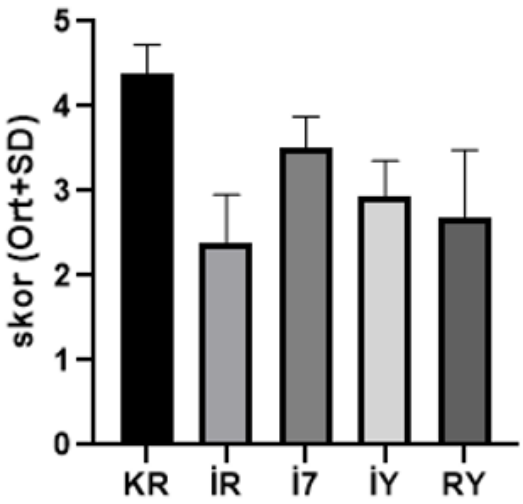
Mason Trikrom	
KR	İR
	
İ7	İY
	
RY	
	

MT boyaması sonrası yapılan skorlamada; KR grubunun ortalama skoru 4,38, İR grubunun ortalama skoru 2,38, İ7 grubunun ortalama skoru 3,5, İY grubunun ortalama skoru 2,94 ve RY grubunun ortalama skoru 2,69 olarak hesaplandı. En

yüksek ve en düşük skorlar sırasıyla; KR grubu için 5 ve 4, İR grubu için 3 ve 1,5, İ7 grubu için 4 ve 3, İY grubu için 3,5 ve 2,5, RY grubu için ise 4 ve 2 olarak bulundu. İlgili sonuçlar Tablo 13 ve Grafik 6'da verildi.

Tablo 13. MT boyama skorlama sonuçları

Gruplar	**KR**	**İR**	**İ7**	**İY**	**RY**
Sayı	8	8	8	8	8
En düşük	4,000	1,500	3,000	2,500	2,000
En yüksek	5,000	3,000	4,000	3,500	4,000
Aralık	1,000	1,500	1,000	1,000	2,000
Ortalama	4,375	2,375	3,500	2,938	2,688
Standart Sapma	0,3536	0,5825	0,3780	0,4173	0,7990



Grafik 6. MT boyama skorlama sonuçları

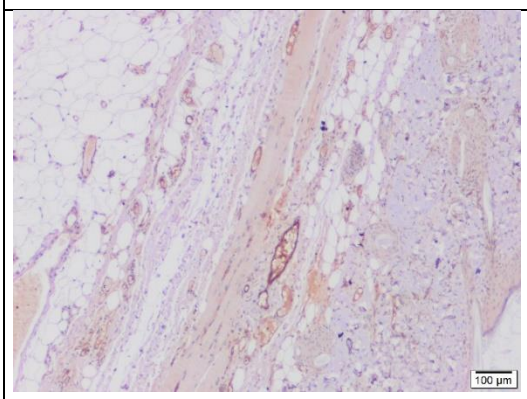
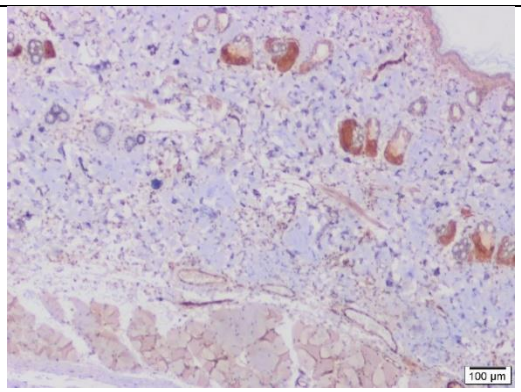
Kollajen yapısı ve yoğunluğu bakımından yapılan skorlamanın istatistiksel değerlendirilmesinde; KR grubu ile diğer tüm gruplar arasında anlamlı fark saptandı. İR grubu ile MEC uygulaması yapılan tüm gruplar karşılaştırıldığında, sadece İ7 grubu İR grubuna göre, istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu (p=0,0014). MEC uygulanan grupların kendi arasındaki karşılaştırmada ise; İ7 grubu RY grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunurken (p=0,0331), İY grubu ile arasında anlamlı fark saptanmadı. İY ile RY grupları arasında da anlamlı bir fark saptanmadı (p=0,8799). İlgili sonuçlar Tablo 14'te paylaşıldı.

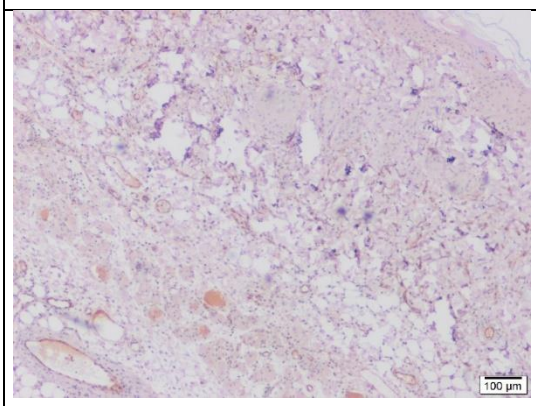
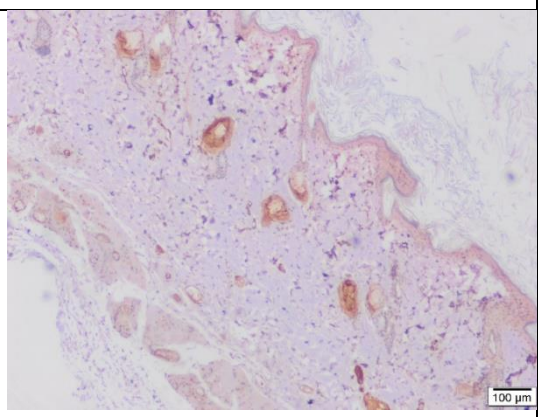
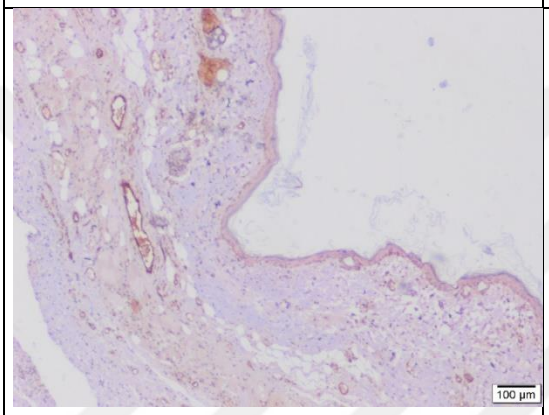
Tablo 14. MT skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Karşılaştırma	Ortalama fark	95,00% Güven aralığında fark	P Değeri
KR -İR	2,000	1,234'ten 2,766	**<0,0001**
KR -İ7	0,8750	0,1090'dan 1,641	**0,0185**
KR - İY	1,438	0,6715'ten 2,203	**<0,0001**
KR - RY	1,688	0,9215'ten 2,453	**<0,0001**
İR - İ7	-1,125	-1,891'den -0,3590	**0,0014**
İR- İY	-0,5625	-1,328'den 0,2035	0,2382
İR - RY	-0,3125	-1,078'den 0,4535	0,7664
İ7 - İY	0,5625	-0,2035'ten 1,328	0,2382
İ7 - RY	0,8125	0,04651'den 1,578	**0,0331**
İY - RY	0,2500	-0,5160'dan 1,016	0,8799

Oksidatif stres belirteci olarak eNOS için KR ile karşılaştırıldığında İR için artış izlendi. MEC uygulamalarının bunları tersine çevirdiği izlendi (Tablo 15).

Tablo 15. Gruplara göre eNOS boyama kesitleri, x100 büyütme

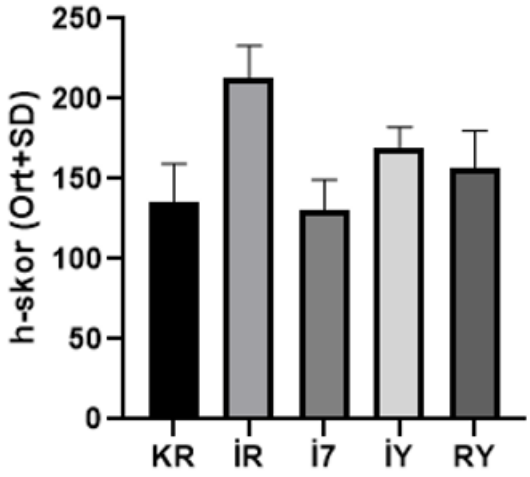
eNOS	
KR	İR
	

İ7	İY
	
RY	
	

eNOS immünohistokimyasal işaretlemesi sonrası yapılan h skorlamasında; KR grubunun ortalama skoru 135,3, İR grubunun ortalama skoru 213,1, İ7 grubunun ortalama skoru 130,3, İY grubunun ortalama skoru 169,9, RY grubunun ise ortalama skoru 156,9 olarak hesaplandı. Böylece, iskemi-reperfüzyon uygulanan gruplar arasında en düşük skor ortalamasına sahip grup, İ7 grubu olduğu saptandı. En yüksek ve en düşük skorlar ise sırasıyla; KR grubu için 169,1 ve 89,25, İR grubu için 238,0 ve 184,2, İ7 grubu için 170,0 ve 109,6, İY grubu için 190,8 ve 145,9, RY grubu için ise 191,3 ve 131,4 olarak bulundu. İlgili skorlama sonuçları Tablo 16 ve Grafik 7'de sunuldu.

Tablo 16. eNOS boyama skorlama sonuçları

Grup	KR	İR	İ7	İY	RY
Sayı	8	8	8	8	8
En düşük	89,2	184,2	109,6	145,9	131,4
En yüksek	169,1	238,0	170,0	190,8	191,3
Aralık	79,83	53,84	60,39	44,89	59,88
Ortalama	135,3	213,1	130,3	169,9	156,9
Standart sapma	24,22	20,16	19,20	12,42	23,23



Grafik 7. eNOS boyama skorlama sonuçları

eNOS düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde; KR ile diğer tüm gruplar karşılatırıldığında, İ7 grubu dışında diğer karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlı fark bulundu. İR grubu ile MEC uygulanan gruplar karşılaştırıldığında da tüm MEC uygulanan gruplar İR grubuna göre anlamlı bir şekilde eNOS düzeyi bakımından daha düşük saptandı. MEC uygulanan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında ise; İ7

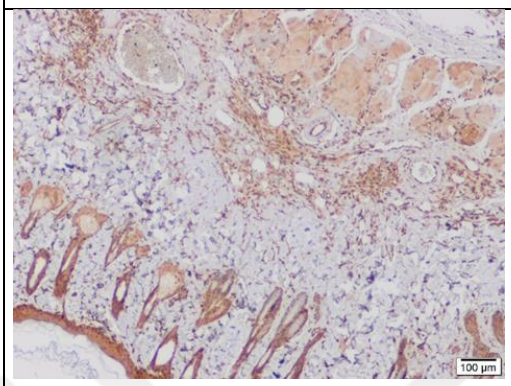
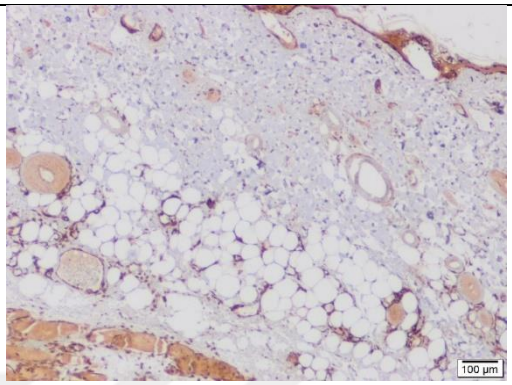
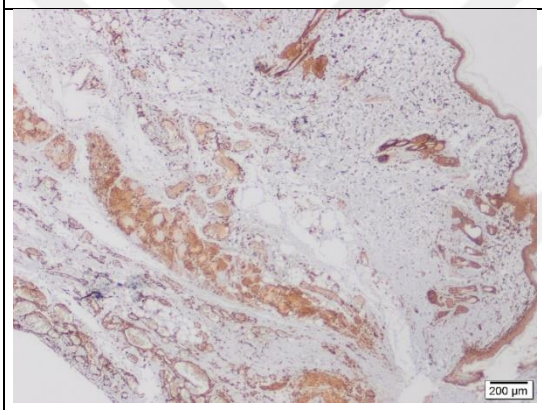
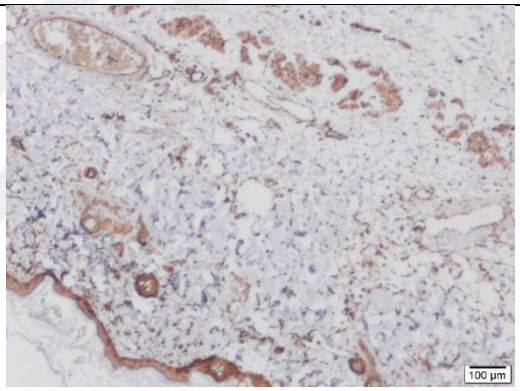
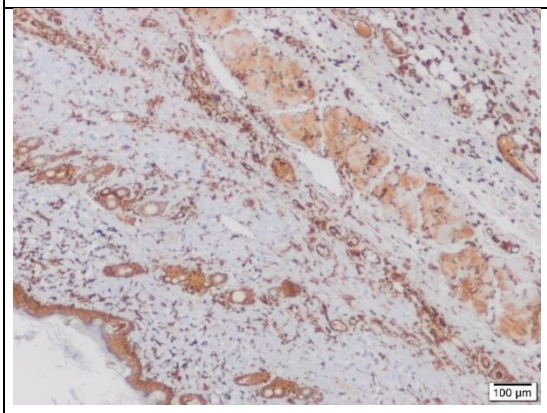
grubu İY grubuna göre istatistiksel anlamlı düşük (p=0,0035) bulunurken, İ7-RY ve İY-RY grup karşılaştırmalarında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 17).

Tablo 17. eNOS skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Karşılaştırma	**Ortalama fark**	**95,00% Güven aralığında fark**	**P değeri**
KR -İR	-77,74	-106,9'dan -48,60	<0,0001
KR - İ7	5,054	-24,09'dan 34,20	**0,9870**
KR - İY	-34,60	-63,75'ten -5,456	0,0133
KR - RY	-21,57	-50,71'den 7,579	0,2315
İR - İ7	82,80	53,65'ten 111,9	**<0,0001**
İR - İY	43,14	13,99'dan 72,29	**0,0013**
İR - RY	56,18	27,03'ten 85,32	**<0,0001**
İ7 - İY	-39,66	-68,80'den -10,51	**0,0035**
İ7 - RY	-26,62	-55,77'den 2,525	0,0873
İY - RY	13,04	-16,11'den 42,18	0,7014

Apoptoz belirteci olarak Kaspaz 3 için KR ile karşılaştırıldığında İR için artış izlendi. MEC uygulamalarının bu artışı tersine çevirdiği gözlendi. İlgili immünohistokimyasal boyama fotoğrafları Tablo 18'de sunuldu.

Tablo 18. Gruplara göre Kaspaz 3 boyama kesitleri, x100 büyütme

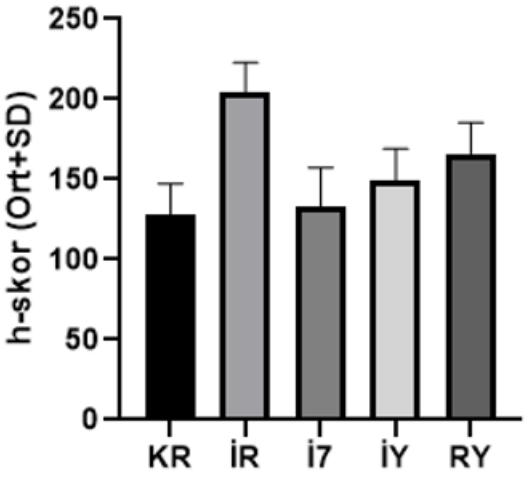
Kaspaz 3	
KR	İR
	
İ7	İY
	
RY	
	

Kaspaz 3 immünohistokimyasal işaretlemesi sonrası yapılan h skorlamasında; KR grubunun ortalama skoru 127,5, İR grubunun ortalama skoru 204,3, İ7 grubunun ortalama skoru 133,3, İY grubunun ortalama skoru 149,4, RY grubunun ise ortalama

skoru 165,4 olarak hesaplandı. Böylece, iskemi-reperfüzyon uygulanan gruplar arasında en düşük skor ortalamasına sahip grup, İ7 grubu olduğu saptandı. En yüksek ve en düşük skorlar ise sırasıyla; KR grubu için 152,6 ve 89,25, İR grubu için 229,9 ve 174,0, İ7 grubu için 170,0 ve 97,85, İY grubu için 178,5 ve 120,6, RY grubu için ise 191,3 ve 129,7 olarak bulundu. İlgili skorlama sonuçları Tablo 19 ve Grafik 10'da sunuldu.

Tablo 19. Kaspaz 3 boyama skorlama sonuçları

Karşılaştırma	**KR**	**İR**	**İ7**	**İY**	**RY**
Sayı	8	8	8	8	8
En düşük	89,2	174,0	97,85	120,6	129,7
En yüksek	152,6	229,9	170,0	178,5	191,3
Aralık	63,37	55,95	72,15	57,91	61,53
Ortalama	127,5	204,3	133,3	149,4	165,4
Standart sapma	20,03	18,73	24,13	19,55	19,99



Grafik 8. Kaspaz 3 boyama skorlama sonuçları

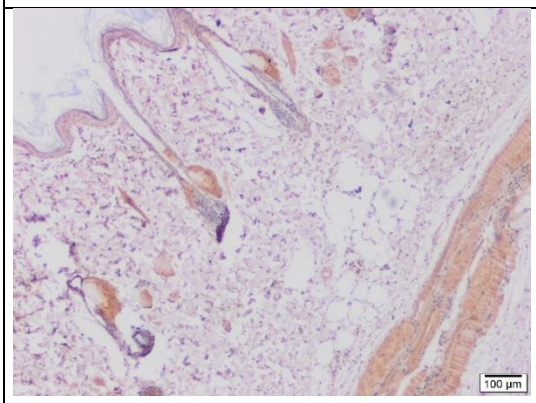
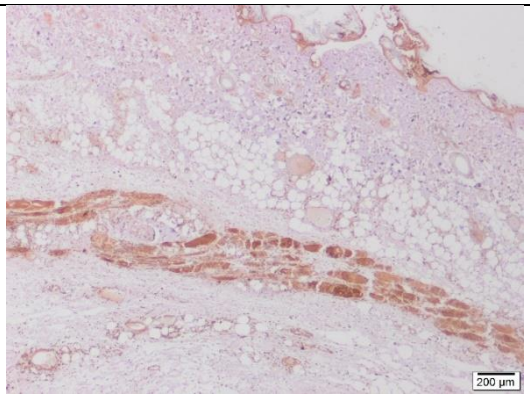
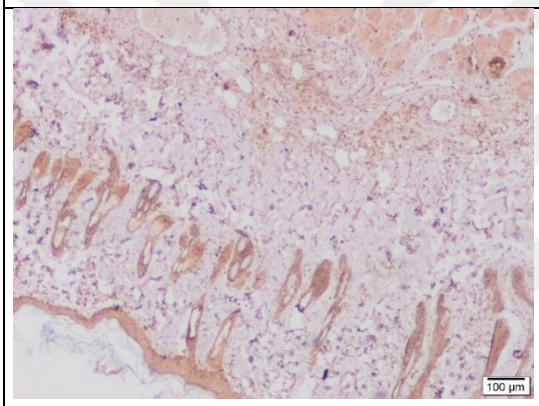
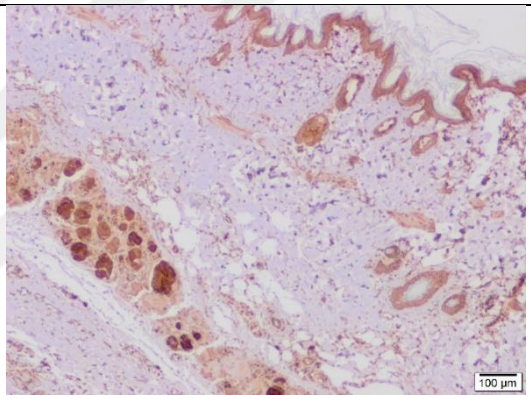
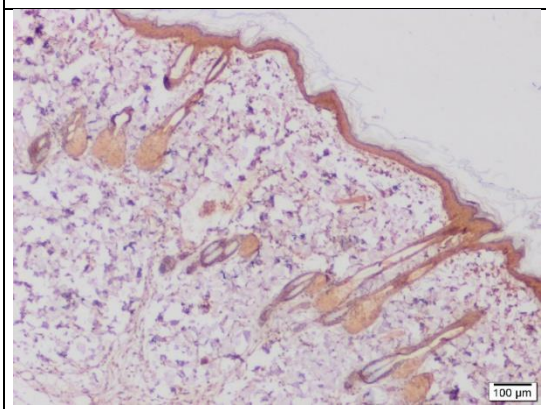
Kaspaz 3 düzeyleri istatistiksel olarak incelendiğinde; KR ile diğer tüm gruplar karşılaştırıldığında, İ7 ve İY grubu dışında diğer karşılaştırmalarda istatistiksel anlamlı fark bulundu. İR grubu ile MEC uygulanan gruplar karşılaştırıldığında da tüm MEC uygulanan gruplar İR grubuna göre anlamlı bir şekilde Kaspaz 3 düzeyi bakımından daha düşük saptandı. MEC uygulanan gruplar kendi arasında karşılaştırıldığında ise; Kaspaz 3 düzeyleri, İ7 grubunda RY grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha

düşük (p=0,028) bulunurken, İ7-İY ve İY-RY grup karşılaştırmalarında anlamlı fark saptanmadı (Tablo 20).

Tablo 20. Kaspaz 3 skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Karşılaştırma	Ortalama fark	95,00% Güven aralığında fark	P Değeri
KR - İR	-76,77	-106,34'ten -47,20	<0,001
KR - İ7	-5,79	-35,36'dan 23,78	**0,980**
KR - İY	-21.88	-51,45'ten 7,69	**0,232**
KR - RY	-37,90	-67,47'den -8,33	0,006
İR - İ7	70,97	41,41'den 100,55	**<0,001**
İR - İY	54,89	25,32'den 84,46	**<0,001**
İR - RY	38,87	9,30'dan 68,44	**0,005**
İ7 - İY	-16,09	-45,66'dan 13,48	0,529
İ7 - RY	-32,11	-61,68'den -2,54	**0,028**
İY - RY	-16,02	-45,59'dan 13,55	0,533

İnflamasyonun belirteci olarak IL1b için KR ile karşılaştırıldığında İR için artış izlendi. MEC uygulamalarının bu artışı tersine çevirdiği izlendi. Gruplara göre ilgili immünhistokimyasal boyama kesitleri Tablo 21'de verildi.

IL1 beta	
KR	İR
	
İ7	İY
	
RY	
	

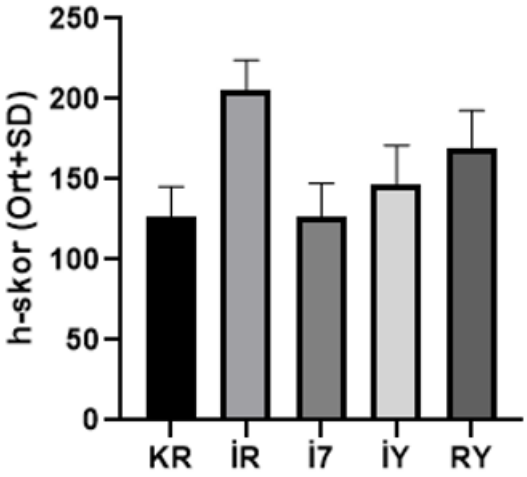
Tablo 21. Gruplara göre IL1 beta boyama kesitleri, x100 büyütme

IL1 beta düzeylerinin karşılaştırılması için yapılan h skorlamasında; KR grubunun ortalama skoru 126,3, İR grubunun ortalama skoru 205,4, İ7 grubunun

ortalama skoru 127,1, İY grubunun ortalama skoru 147,0, RY grubunun ise ortalama skoru 169,8 olarak hesaplandı. Böylece, iskemi reperfüzyon uygulanan gruplar arasında IL1 beta düzeyi ortalaması en az olan grup, İ7 grubu olarak belirlendi. En yüsek ve en düşük skorlar ise sırasıyla; KR grubu için 152,6 ve 89,25, İR grubu için 229,9 ve 174,0, İ7 grubu için 170,0 ve 105,4, İY grubu için 178,5 ve 103,6, RY grubu için ise 198,5 ve 129,7 olarak bulundu. Skorlama sonuçları Tablo 22 ve Grafik 11'de verildi.

Tablo 22. IL1 beta boyama skorlama sonuçları

Grup	**KR**	**İR**	**İ7**	**İY**	**RY**
Sayı	8	8	8	8	8
En düşük	89,25	174,0	105,4	103,6	129,7
En yüksek	152,6	229,9	170,0	178,5	198,5
Aralık	63,37	55,95	64,65	74,91	68,80
Ortalama	126,3	205,4	127,1	147,0	169,8
Standart sapma	19,22	18,87	20,62	24,06	23,10



Grafik 9. IL1 beta boyama skorlama sonuçları

IL1 beta düzeyleri istatistiksel olarak incelendi. KR grubunun düzeyleri, diğer tüm gruplarla teker teker karşılaştırıldığında, İ7 ve İY grupları dışında istatistiksel anlamlı fark saptandı. MEC uygulanan grupların düzeyleri, İR grubunun düzeylerine göre istatistiksel anlamlı olarak düşük bulundu. MEC grupları kendi aralarına karşılaştırıldığında ise; IL1 beta düzeyleri, İ7 grubunda RY grubuna göre anlamlı

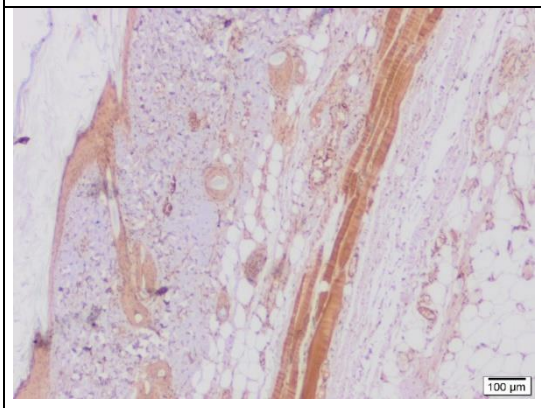
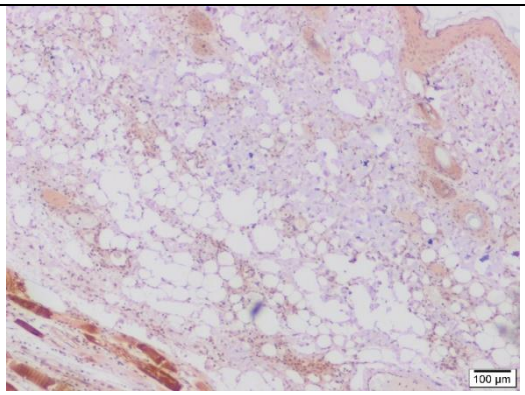
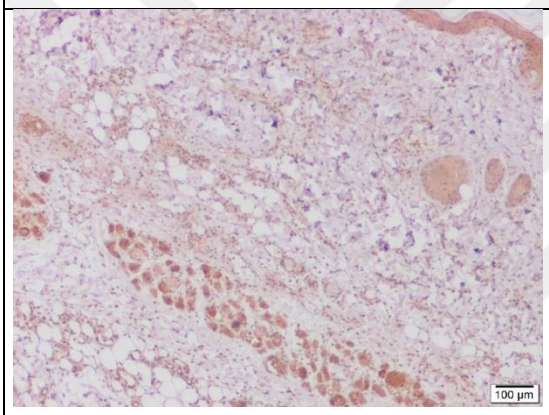
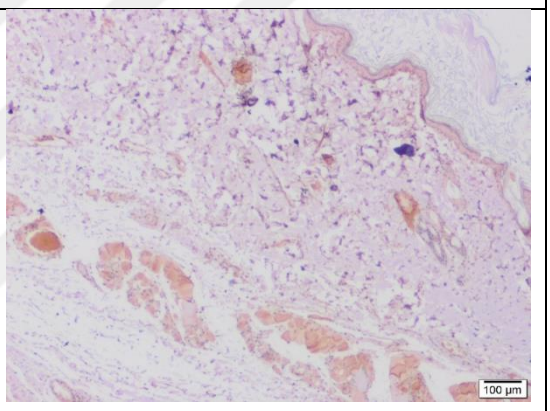
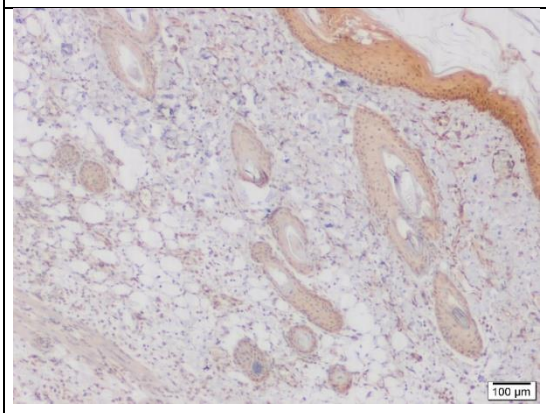
şekilde daha düşük bulundu (p=0,0026). İ7-İY ve İY-RY gruplarının karşılaştırılmalarında ise istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmadı (Tablo 23).

Tablo 23. IL1beta skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Karşılaştırma	Ortalama fark	95,00% Güven aralığında fark	P değeri
KR vs. İR	-79,15	-109,7 to -48,56	<0,0001
KR vs. İ7	-0,7925	-31,38 to 29,79	**>0,9999**
KR vs. İY	-20,76	-51,34 to 9,828	**0,3105**
KR vs. RY	-43,53	-74,11 to -12,94	0,0021
İR vs. İ7	78,35	47,77 to 108,9	**<0,0001**
İR vs. İY	58,39	27,81 to 88,97	**<0,0001**
İR vs. RY	35,62	5,035 to 66,20	**0,0157**
İ7 vs. İY	-19,96	-50,55 to 10,62	0,3483
İ7 vs. RY	-42,74	-73,32 to -12,15	**0,0026**
İY vs. RY	-22,77	-53,36 to 7,813	0,2263

Damarlanma belirteci olarak VEGF için KR ile karşılaştırıldığında İR için azalış izlendi. MEC uygulamalarının bunları tersine çevirdiği saptandı. İlgili boyama kesitlerinin fotoğrafları Tablo 24'te sunuldu.

Tablo 24. Gruplara göre VEGF boyama kesitleri, x100 büyütme

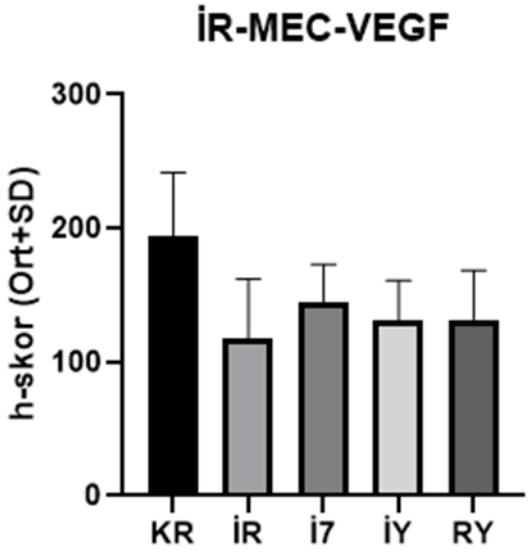
<table>
<tr><td colspan="2">IL1 beta</td></tr>
<tr><td>KR</td><td>İR</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>İ7</td><td>İY</td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
<tr><td>RY</td><td></td></tr>
<tr><td></td><td></td></tr>
</table>

VEGF açısından yapılan h skorlamasında, İR uygulanan gruplar arasında en yüksek ortalamaya sahip olan grup, 141,2 ortalama ile, İ7 grubu oldu. KR grubunun ortalaması 207,0, İR grubunun ortalaması 104,1, İY grubunun ortalaması 125,9 ve RY grubunun ortalaması 124,4 olarak hesaplandı. En yüksek ve en düşük skorlar ise sırasıyla; KR

grubunda 242,1 ve 174,0, İR grubunda 121,7 ve 77,62, İ7 grubunda 174,4 ve 97,85, İY grubunda 154,4 ve 78,46, RY grubunda ise 155,0 ve 64,59 olarak bulundu. Skorlama sonuçları Tablo 25 ve Grafik 12'de sunuldu.

Tablo 25. VEGF boyama skorlama sonuçları

Grup	**KR**	**İR**	**İ7**	**İY**	**RY**
Sayı	8	8	8	8	8
En düşük	174,0	77,62	97,85	78,46	64,59
En yüksek	242,1	121,7	174,4	154,4	155,0
Aralık	68,11	44,10	76,57	75,97	90,45
Ortalama	207,0	104,1	141,2	125,9	124,4
Standart sapma	22,38	17,06	26,95	25,58	28,17



Grafik 10. VEGF boyama skorlama sonuçları

VEGF düzeyleri açısından yapılan skorlama istatistiksel olarak incelendi. KR grubunun düzeyleri diğer gruplara göre anlamlı şekilde yüksek bulundu. İR grubunun düzeyleri ile karşılaştırıldığında, MEC uygulanan gruplar arasında sadece İ7 grubunun VEGF düzeyleri anlamlı şekilde yüksek (p= 0,033) bulundu. MEC grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise; anlamlı fark saptanmadı. İlgili post hoc Tukey testi ile karşılaştırmaya ait sonuçlar Tablo 26'da sunuldu.

Tablo 26. VEGF skorlama sonuçlarına göre grupların çoklu karşılaştırma analizi (post hoc Tukey testi)

Karşılaştırma	Ortalama fark	95,00% Güven aralığında fark	P değeri
KR-İR	102.902	67,89'dan 137,92	< **.001**
KR - İ7	65.805	30.79'dan 100,82	< **.001**
KR - İY	81.152	46.14'ten 116.16	< **.001**
KR - RY	82.649	47.64'ten 117.66	< **.001**
İR - İ7	-37.097	-72.11'den -2.085	**0.033**
İR - İY	-21.750	-56.76'dan 13.262	0.398
İR - RY	-20.254	-55.26'dan 14.76	0.469
İ7 - İY	15.348	-19.66'dan 50.36	0.717
İ7 - RY	16.844	-18.17'den 51.86	0.642
İY - RY	1.496	-33.52'den 36.51	1.000

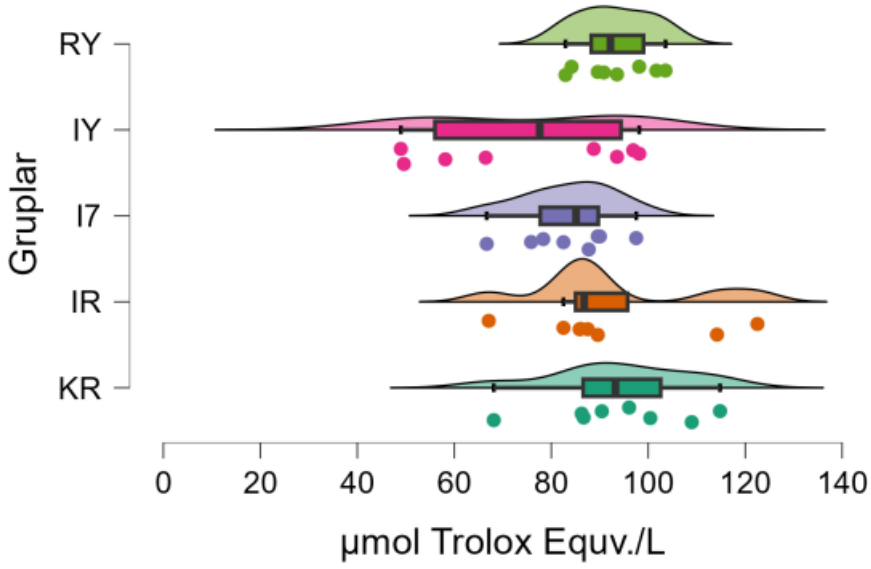
4.3. Biyokimyasal Değerlendirme Bulguları

Postoperatif 24. saatte kuyruk veni kanından elde edilen serumlarda çalışılan TAC değerleri değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede; TAC düzeyi ortalamaları, KR grubu için 93,98 µmol Trolox Equv./L, İR grubu için 91,92 µmol Trolox Equv./L, İ7 grubu için 83,54 µmol Trolox Equv./L, İY grubu için 75,07 µmol Trolox Equv./L ve RY grubu için 93,07 µmol Trolox Equv./L olarak hesaplandı. İlgili sonuçlar Tablo 26'da ve TAC değeri dağılımları Grafik 16'da verildi.

Tablo 27. Postoperatif 24. Saat TAC değeri sonuçları

Tanımlayıcı testler (TAC düzeyi)

Grup	N	Ortalama	SD	SE	Varyasyon katsayısı
KR	**8**	**93.979**	**14.627**	**5.171**	**0.156**
İR	**8**	**91.922**	**17.858**	**6.314**	**0.194**
İ7	**8**	**83.536**	**9.731**	**3.440**	**0.116**
İY	**8**	**75.073**	**21.474**	**7.592**	**0.286**
RY	**8**	**93.068**	**7.642**	**2.702**	**0.082**



Grafik 11. Gruplara göre postoperatif 24. Saat TAC düzeyi dağılımı

İlgili sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. İlk olarak varyans homojenite testi olan Levene testi yapıldı ve p değeri 0,010 olarak hesaplandı. Bunun üzerine Brown-Forsythe düzeltilmesi yapıldı ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,088, Tablo 27).

Tablo 28. Postoperatif 24. Saat TAC düzeyleri açısından istatistiksel analiz

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
Brown-Forsythe	Gruplar	2101.38	4	525.346	2.290	0.088

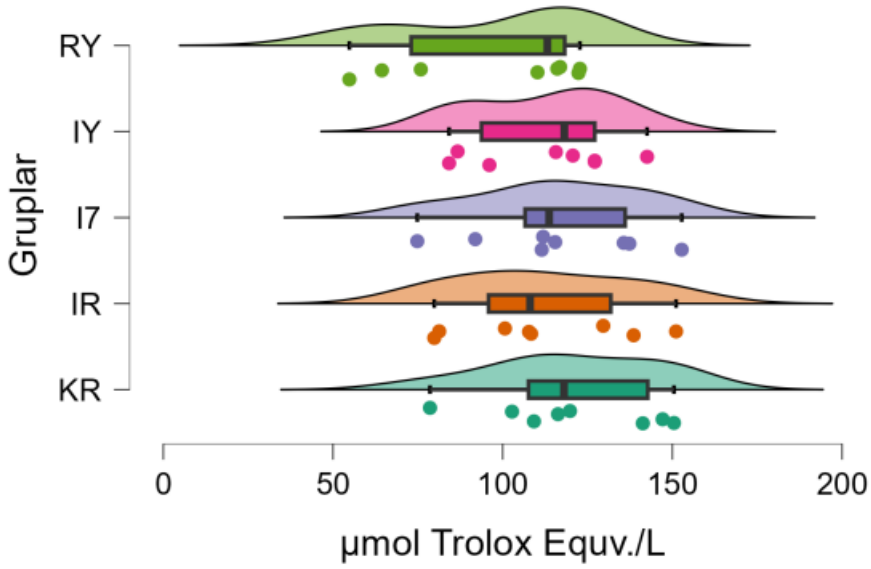
Not. Tip III Kareler toplamı

Ötenazi öncesi intrakardiyak kandan elde edilen serumlarda çalışılan TAC değerleri değerlendirildi. Yapılan değerlendirmede; TAC düzeyi ortalamaları, KR grubu için 120.672 µmol Trolox Equv./L, İR grubu için 112.130 µmol Trolox Equv./L, İ7 grubu için 116.401 µmol Trolox Equv./L, İY grubu için 112.495 µmol Trolox Equv./L ve RY grubu için 97.911 µmol Trolox Equv./L olarak hesaplandı. İlgili sonuçlar Tablo 28'de ve TAC değeri dağılımları Grafik 17'de verildi.

Tablo 29. Ötenazi öncesi TAC değeri sonuçları

Tanımlayıcı testler (TAC düzeyi)

Grup	N	Ortalama	SD	SE	Varyasyon katsayısı
KR	**8**	**120.672**	**24.658**	**8.718**	**0.204**
İR	**8**	**112.130**	**25.862**	**9.144**	**0.231**
İ7	**8**	**116.401**	**25.363**	**8.967**	**0.218**
İY	**8**	**112.495**	**21.187**	**7.491**	**0.188**
RY	**8**	**97.911**	**28.082**	**9.929**	**0.287**



Grafik 12. Ötenazi öncesi TAC düzeyi dağılımı

İlgili sonuçlar istatistiksel olarak değerlendirildi. İlk olarak varyans homojenite testi olan Levene testi yapıldı ve p değeri 0,827 olarak hesaplandı. Bunun üzerine ANOVA testi ile devam edildi ve gruplar arasında istatistiksel anlamlı fark saptanmadı (p=0,458, Tablo 29).

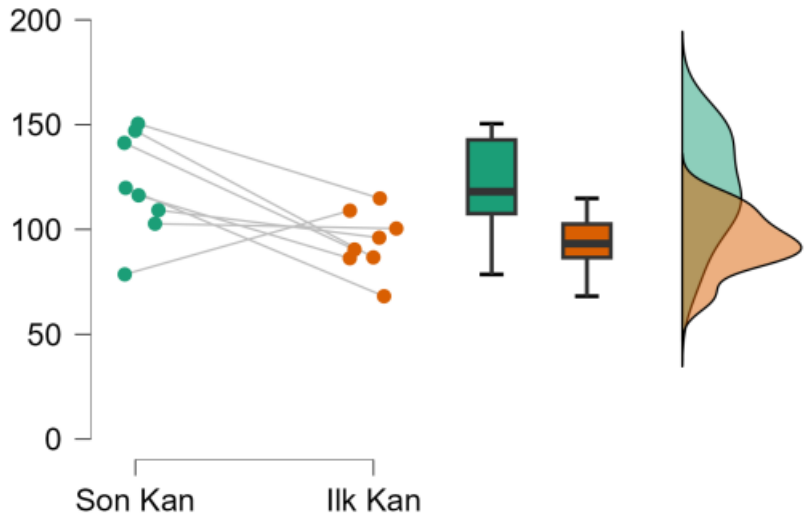
Tablo 29. Ötenazi öncesi TAC düzeylerinin istatistiksel analizi

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
ANOVA	Gruplar	2346.311	4	586.578	0.929	0.458

Not. Tip III Kareler toplamı

Ardından, gruplar kendi içerisinde, postoperatif 24. saat ve ötenazi öncesi TAC değerleri açısından analiz edildi.

KR grubunun, ortalama postoperatif 24. Saat TAC değeri (İlk kan) 93.98 Trolox Equv./L, ortalama ötenazi öncesi TAC değeri (Son kan) 120.672 Trolox Equv./L olarak hesaplandı. Tüm değerler üzerinden Shapiro Wilk normal dağılım testi yapıldı ve p değeri 0.494 olarak bulundu. Bunun üzerine bağımlı örneklem t testi ile devam edildi. KR grubu için postoperatif 24. Saat TAC değeri ile ötenazi öncesi TAC değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (p=042). TAC düzeyi değişim dağılımları Grafik 17'de, t testi sonucu ise Tablo 30'da sunuldu.

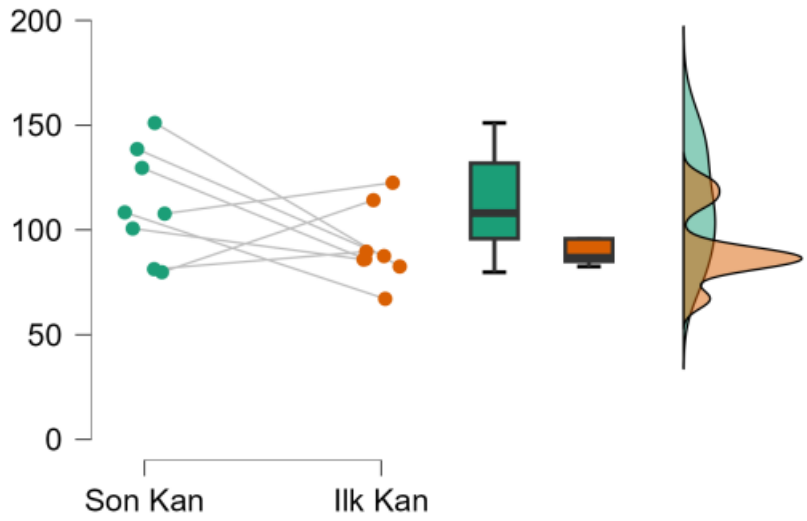


Grafik 13. KR grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları

Tablo 30. KR grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi

Ölçüm 1	Ölçüm 2	t	df	p
İlk Kan	Son kan	−2.482	7	0.042

İR grubunun, ortalama postoperatif 24. Saat TAC değeri 91,92 Trolox Equv./L, ortalama ötenazi öncesi TAC değeri 112,13 Trolox Equv./L olarak hesaplandı. Tüm değerler üzerinden Shapiro Wilk normal dağılım testi yapıldı ve p değeri 0.623 olarak bulundu. Bunun üzerine bağımlı örneklem t testi ile devam edildi. İR grubu için postoperatif 24. Saat TAC değeri ile ötenazi öncesi TAC değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmadı (p=0,161). TAC düzeyi değişim dağılımları Grafik 18'de, t testi sonucu ise Tablo 31'de sunuldu.



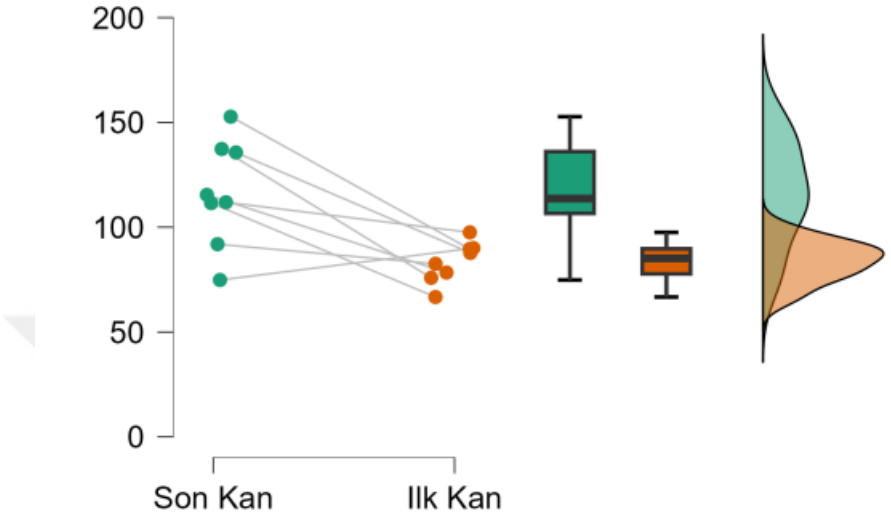
Grafik 14. İR grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları

Tablo 31. İR grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi

Ölçüm 1	Ölçüm 2	t	df	p
İlk Kan	Son kan	−1.566	7	0.161

İ7 grubunun, postoperatif 24. Saat ortalama TAC değeri 83,54 Trolox Equv./L, ötenazi öncesi ortalama TAC değeri 116,40 Trolox Equv./L olarak bulundu. Tüm

sonuçlar dahil edilerek, grup içerisinde, Shapiro Wilk normal dağılım testi yapıldı. P değeri 0.472 olarak bulundu. Böylece bağımlı örneklem t testi ile devam edildi. İ7 grubu için postoperatif 24. Saat TAC değeri ile ötenazi öncesi TAC değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (p=0,012). TAC düzeyi değişim dağılımları Grafik 19'da, t testi sonucu ise Tablo 32'de verildi.

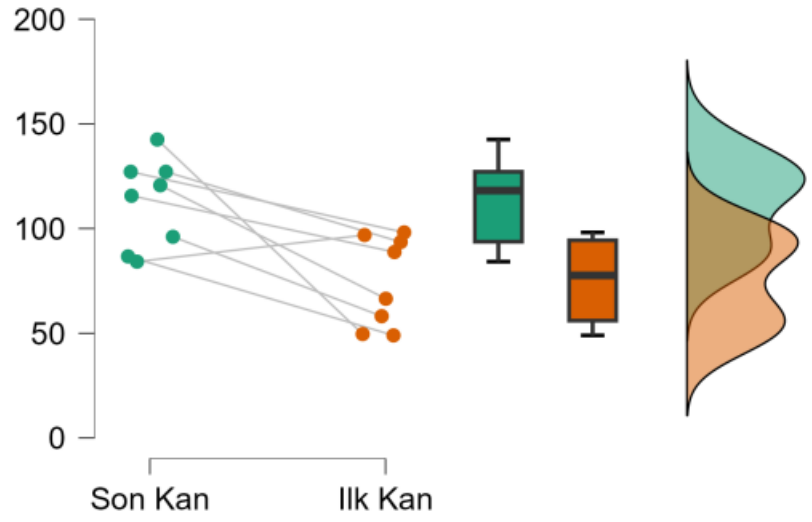


Grafik 15. İ7 grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları

Tablo 32. İ7 grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi

Ölçüm 1	Ölçüm 2	t	df	p
İlk Kan	Son kan	−3.370	7	0.012

İY grubunun, postoperatif 24. Saat ortalama TAC değeri 75.07 Trolox Equv./L, ötenazi öncesi ortalama TAC değeri 112,50 Trolox Equv./L olarak bulundu. Tüm sonuçlar dahil edilerek, grup içerisinde, Shapiro Wilk normal dağılım testi yapıldı. P değeri 0.357 olarak bulundu. Böylece bağımlı örneklem t testi ile devam edildi. İY grubu için postoperatif 24. Saat TAC değeri ile ötenazi öncesi TAC değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı (p=0,009). TAC düzeyi değişim dağılımları Grafik 20'de, t testi sonucu ise Tablo 33'de verildi.

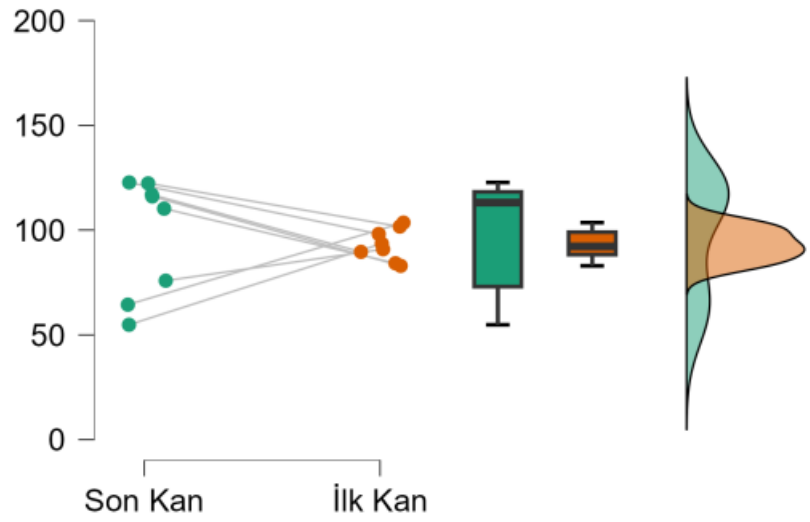


Grafik 16. İY grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları

Tablo 33. İY grubu için TAC düzeyi değişimi açısından bağımlı örneklem t testi

Ölçüm 1	Ölçüm 2	t	df	p
İlk Kan	Son kan	−3.594	7	0.009

RY grubunun, postoperatif 24. Saat ortalama TAC değeri 93,07 Trolox Equv./L, ötenazi öncesi ortalama TAC değeri 97,91 Trolox Equv./L olarak bulundu. Grup içerisinde normal dağılımın olup olmadığını saptamak amacıyla, Shapiro Wilk testi yapıldı. P değeri 0.019 olarak bulundu. Normal dağılım olmadığı teyit edildikten sonra, bağımlı örneklem t testi yerine, Wilcoxon işaretli sıralar testi uygulandı. İlgili test analizi sonrası, RY grubu için postoperatif 24. Saat TAC değeri ile ötenazi öncesi TAC değeri arasında istatistiksel olarak anlamlı artış saptanmadı (p=0,844). TAC düzeyi değişim dağılımları Grafik 21'de, Wilcoxon işaretli sıralar testi sonucu ise Tablo 34'te verildi.

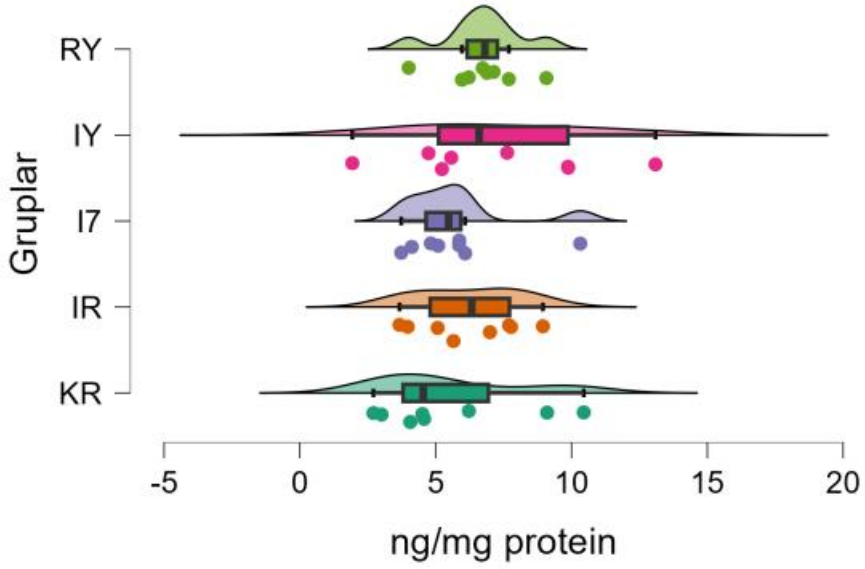


Grafik 17. RY grubu için TAC düzeyi değişim dağılımları

Tablo 34. RY grubu için TAC düzeyi değişimi açısından Wilcoxon işaretli sıralar testi

Ölçüm 1	Ölçüm 2	W	z	p
İlk Kan	Son kan	16.000	−0.280	0.844

Ötenazi öncesi alınan tam kat doku biyopsi materyallerinde, SOD düzeyleri analiz edildi. SOD düzeyleri ortalamaları gruplara göre; KR grubu için 5,58 ng/mg protein, İR grubu için 6,22 ng/mg protein, İ7 grubu için 5,74 ng/mg protein, İY grubu için 7,24 ng/mg protein ve RY grubu için 6,71 ng/mg protein olarak hesaplandı. Varyans homojenitesi açısından Levene testi uygulandı ve p değeri 0,063 olarak bulundu. ANOVA testinde SOD düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,653, Tablo 35). Gruplara ait SOD düzeylerine ait dağılım Grafik 22'de sunuldu.



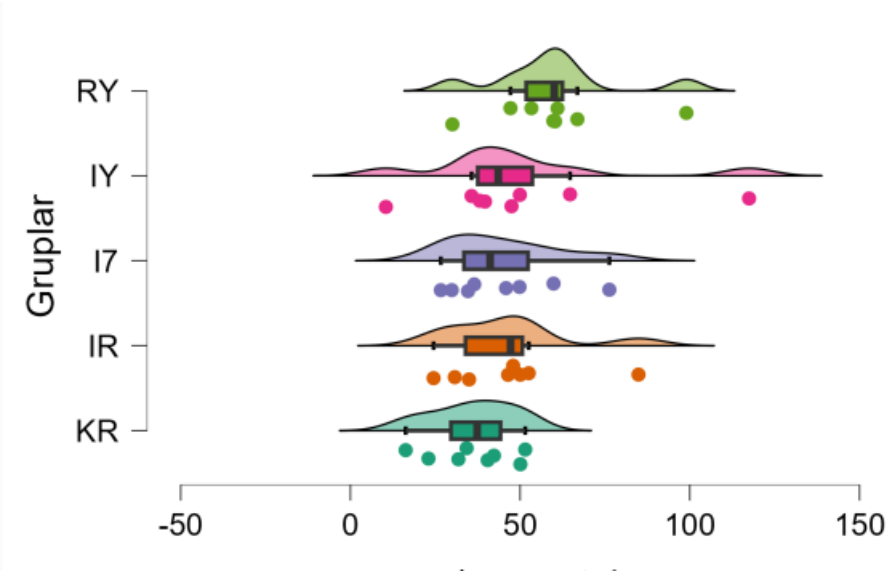
Grafik 18. Gruplara göre SOD düzeyi dağılımı

Tablo 35. SOD düzeyleri açısından istatistiksel analiz

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
ANOVA	Gruplar	15.208	4	3.802	0.618	0.653

Not. Tip III Kareler toplamı

Biyokimyasal inceleme için alınan doku biyopsi materyallerinde, GSH düzeyleri analiz edildi. GSH düzeyi ortalamaları gruplara göre; KR grubu için 36,19 ng/mg protein, İR grubu için 46,49 ng/mg protein, İ7 grubu için 44,92 ng/mg protein, İY grubu için 50,42 ng/mg protein ve RY grubu için 59,67 ng/mg protein olarak hesaplandı. Varyans homojenitesi açısından Levene testi uygulandı ve p değeri 0,647 olarak bulundu. ANOVA testinde GSH düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,263). Gruplara ait GSH düzeylerine ait dağılım Grafik 23'te ve istatistiksel analiz Tablo 36'da sunuldu.



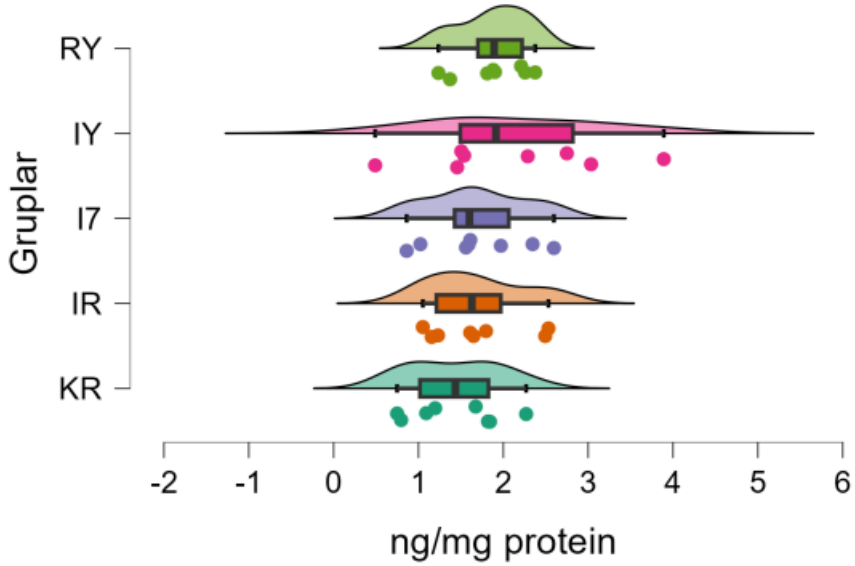
Grafik 19. Gruplara göre GSH düzeyi dağılımı

Tablo 36. GSH düzeyleri açısından istatistiksel analiz

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
ANOVA	Gruplar	2336.924	4	584.231	1.372	0.263

Not. Tip III Kareler toplamı

Dokuya ait biyokimyasal incelemelere devam edildi. MPO değerleri analiz edildi. MPO düzeyi ortalamaları gruplara göre; KR grubu için 1,43 ng/mg protein, İR grubu için 1,69 ng/mg protein, İ7 grubu için 1,69 ng/mg protein, İY grubu için 2,12 ng/mg protein ve RY grubu için 1,88 ng/mg protein olarak hesaplandı. Varyans homojenitesi açısından Levene testi uygulandı ve p değeri 0,038 olarak bulundu. Brown-Forsythe düzeltilmesi yapıldı ve MPO düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,370). Gruplara ait MPO düzeylerine ait dağılım Grafik 24'te ve istatistiksel analiz Tablo 37'da sunuldu.



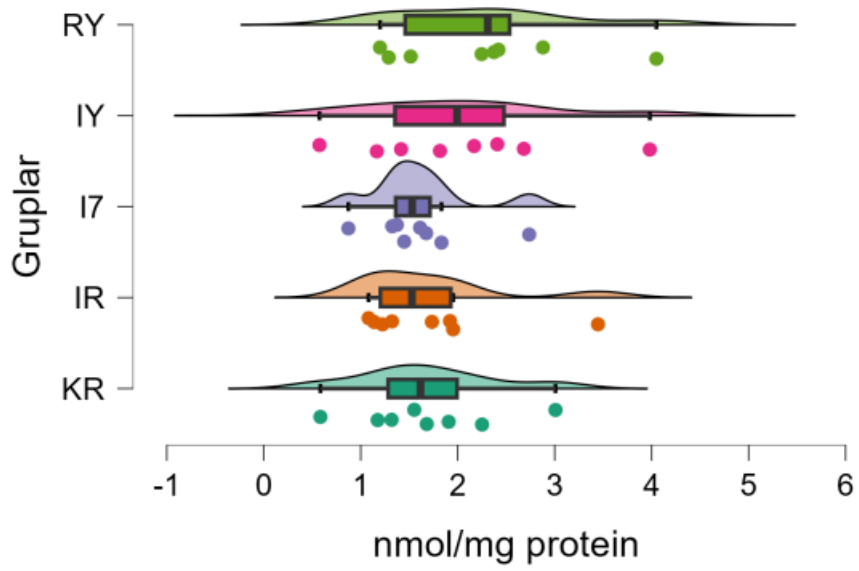
Grafik 20. Gruplara göre MPO düzeyi dağılımı

Tablo 37. MPO düzeyleri açısından istatistiksel analiz

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
Brown-Forsythe	Gruplar	2.093	4	0.523	1.125	0.370

Not. Tip III Kareler toplamı

MDA değerleri analiz edildi. MDA düzeyi ortalamaları gruplara göre; KR grubu için 1,69 nmol/mg protein, İR grubu için 1,73 nmol/mg protein, İ7 grubu için 1,61 nmol/mg protein, İY grubu için 2,03 nmol/mg protein ve RY grubu için 2,45 nmol/mg protein olarak hesaplandı. Varyans homojenitesi açısından Levene testi uygulandı ve p değeri 0,551 olarak bulundu. ANOVA testinde MDA düzeyleri açısından anlamlı fark saptanmadı (p=0,370). Gruplara ait MDA düzeylerine ait dağılım Grafik 25'te ve istatistiksel analiz Tablo 38'de sunuldu.



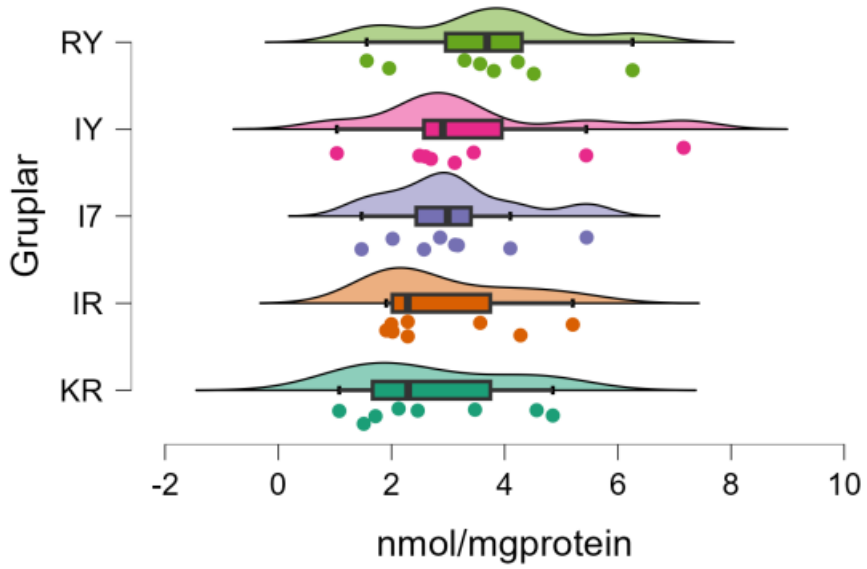
Grafik 21. Gruplara göre MDA düzeyi dağılımı

Tablo 38. MDA düzeyleri açısından istatistiksel analiz

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
ANOVA	Gruplar	2.307	4	0.577	0.844	0.507

Not. Tip III Kareler toplamı

Son olarak AOPP değerleri karşılaştırıldı. Grupların ortalama değerleri; KR grubu için 2,72 nmol/mg protein, İR grubu için 2,94 nmol/mg protein, İ7 grubu için 3,10 nmol/mg protein, İY grubu için 3,50 nmol/mg protein ve RY grubu için 3,65 nmol/mg protein olarak hesaplandı. Levene testinde p değeri 0,796 olarak bulundu. Yapılan ANOVA testine göre, gruplar arasında AOPP değerleri açısından istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (p=0,707). Gruplara ait AOPP düzeylerine ait dağılım Grafik 26'da ve istatistiksel analiz Tablo 39'da sunuldu.



Grafik 22. Gruplara göre AOPP düzeyi dağılımı

Tablo 39. AOPP düzeyleri açısından istatistiksel analiz

Test	Örnekler	Kareler toplamı	df	Ortalama kare	F	p
ANOVA	Gruplar	4.750	4	1.188	0.541	0.707

Not. Tip III Kareler toplamı

5. TARTIŞMA

Pediküllü ve serbest flepler, plastik ve rekonstrüktif cerrahide doku defektlerinin onarımı için giderek daha sık kullanılmaktadır. Flep cerrahisinde başarı oranı %99'a kadar çıkabilse de, en deneyimli cerrahların dahi karşılaşabileceği komplikasyonlar gerçekleşebilmektedir (160). Bu komplikasyonların başında, fleplerin kısmi ya da tam kaybına neden olan vasküler yetersizlikler gelmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı (İRH), vasküler yetersizliklerin en önemli sebep ve sonuçlarından birisidir. Ayrıca, İRH, serbest flep cerrahisi ile organ nakillerinde flep yetmezliği ve organ disfonksiyonunun önemli bir nedenidir(4). Bu durum, hasta morbiditesine ve hastanede yatış süresinin uzamasına neden olabilmektedir. Böylece, tıbbi kaynak tüketimi ve dolayısıyla sağlık maliyetleri artmaktadır (161). İRH konusu, en az plastik cerrahi literatüründe yer aldığı kadar, diğer tıp dallarınını da ilgilendirmektedir. Renal(162), kardiyak(163), over(164), testis(165), beyin(138) ve hepatik(166) İRH konularını araştıran çok sayıda çalışma bulunmaktadır.

İRH'nin patogenezi, iskemi sırasında hücrelerin oksijen ve enerji kaybına uğraması ve reperfüzyon sırasında serbest radikal üretiminin artmasıyla karakterizedir (5). Uzamış iskemi, ATP üretiminin azalmasına yol açarak, hücresel enerji seviyelerinin düşmesine, iyon pompalarının fonksiyonlarını yitirmesine ve hücre içi sodyum ile kalsiyum birikimine neden olur. Bu süreçte oksidatif fosforilasyon duraksar, laktik asit birikimiyle birlikte pH düşer ve hücrede asidoz meydana gelir. İskemi süresi uzadıkça hücre nekrozu gelişir (3). Reperfüzyonun başlamasıyla, iskemik dokulara ani kan ve oksijen girişi sağlanır, ancak bu süreç serbest radikallerin aşırı üretimine neden olarak doku hasarını daha da artırır. Reaktif oksijen türleri (ROS), hücresel yapılar üzerinde oksidatif stres yaratır. Bu durum hücre membranlarında bulunan lipitlerde, proteinlerde ve DNA'da hasara yol açar. İRH patogenezinde ksantin dehidrogenaz/ksantin oksidaz enzim sistemlerinin ROS üretimindeki rolü önemlidir. Aynı zamanda, nötrofiller tarafından aktive edilen NADPH oksidaz ve MPO enzimleri, inflamasyon ve doku hasarını tetikler. Azalmış NO seviyeleri, vasküler disfonksiyona ve mikro dolaşım bozukluklarına yol açarken, hücre içi kalsiyum artışı hücresel apoptotik mekanizmalarını hızlandırır (2). Özetlemek gerekirse, İRH, oksidatif stres, inflamasyon ve enerji metabolizmasındaki bozulmaların etkisiyle doku nekrozuna ve organ fonksiyon kaybına neden olur. Literatürde yer alan deneysel ve klinik tüm çalışmalar da, İRH öncesi, sırası veya

sonrasında yer alan bu basamaklardaki hadiseleri önlemeyi veya etkisini azaltmayı amaçlamaktadır (101).

Mikrocerrahinin gelişimiyle birlikte, serbest ve pediküllü flepler ile defekt onarımlarının ve replantasyon vakalarının sayıları gün geçtikçe artmaktadır. Bu sebepten dolayı, replantasyon işlemlerinin doğasında olan ve serbest flep cerrahisinde karşılaşılma ihtimali her zaman bulunan İRH, çok sayıda deneysel çalışmaya konu olmuştur. Literatürde yer alan deneysel araştırmalarda, serbest flep cerrahisinde yaşanabilecek hem arteryal hem de venöz komplikasyonları taklit edebilmesi açısından sıçan inferior epigastrik ada flebi modeli sıkça kullanılmaktadır (167–169). Bunun nedeni; ilgili flebin kendine ait bir damarsal ağa sahip olması ve bu nedenle rastgele patern bir dolaşıma sahip olmamasıdır (154). İnferior epigastrik ada flebi modelinin yanısıra, sıçan latissimus dorsi kas flebi(170), rektus abdominis kas flebi(6) ve Mcfarlane flebi(171) modellerinde de İRH'yi konu alan çalışmalar mevcuttur. Pediküllü ve aksiyel patern bir flep olması, titiz bir cerrahi yöntemle kaldırıldığında ve uygun boyutlarda tasarlandığında dolaşım problemi göstermemesi, doğrudan pediküle mikroklemp koymadan iskemi oluşturabilme imkanı gibi özelliklerinden dolayı bu çalışmada da inferior epigastrik ada flebi modeli kullanılmıştır. İlgili flep, literatürde yaygın olarak tercih edildiği gibi (10,172), 6X3cm^2 olarak tasarlanmıştır. Böylece rastgele dolaşıma ait oluşabilecek komplikasyonların önüne geçilmesi planlanmıştır. Ayrıca, flepler sadece hayvanların sağ abdominal bölgesinden kaldırılmıştır. Bunun sebebi ise, intraperitoneal enjeksiyonların hayvanların sol abdominal bölgeden yapılması ve fleplere perkütan hasar oluşturulmasından kaçınılmasıdır.

Flep canlılığını artırmaya yönelik geliştirilen yöntemler, hem deneysel hem de klinik çalışmalarda incelenmiştir. Günümüze dek geliştirilen çeşitli yöntemler arasında cerrahi geciktirme, koşullandırma yöntemleri, kök hücre tedavileri ve farmakolojik tedaviler dikkat çekmektedir (5). Cerrahi geciktirme, flebin longitudinal kenarlarının insize edilmesi ve ilk aşamada flebin altındaki dokudan serbestleştirilmesine, ardından 2-3 hafta sonra distal ucun da insize edilerek flebin kaldırılmasına dayanmaktadır. Bu prosedür, özellikle pediküllü fleplerde, kapiller kan akışını artırarak distal nekroz alanını azaltmak amacıyla kullanılmaktadır. Ancak ek cerrahi işlem gerektirdiği için maliyetli ve zaman alıcıdır. Ayrıca, İRH'yi engellemeden çok iskemiye karşı flebi koruma özelliği göstermektedir (78).

Koşullandırma yöntemleri, iskemik ön/sonradan koşullandırma ve uzak iskemik ön/sonradan koşullandırma olarak ayrışır. Günümüzde, İRH'ye karşı koruyucu ve terapötik etkisi kanıtlanmış tek yöntem, iskemik ön koşullandırma tekniğidir (4). Bu yöntem, transfer edilecek dokuya kısa süreli iskemi ve reperfüzyon dönemlerinin uygulanmasını gerektirir. Ön koşullandırma, fonksiyonel kapiller yoğunluğu artırır, lökositlerin yuvarlanmasını, adezyonunu ve migrasyonunu azaltır, endotelyal, nöronal ve indüklenebilir nitrik oksit sentaz seviyelerini yükseltir ve mitokondriyal geçirgenliği azaltır (173). Özellikle elektif serbest doku transferi gibi kontrollü cerrahi durumlarda iskemik ön koşullandırma uygulanabilirken, replantasyon vakalarında ise sonradan koşullandırma daha uygun bir yaklaşımdır (4). Ancak, koşullandırma yöntemleri de ek cerrahi prosedüre bağımlıdır. Aksiyel flep cerrahilerinde, gerek serbest gerekse pediküllü fleplerde, dolaşımın tek kaynağı olan vasküler pedikülü bir klemp ile birkaç kez bloke etmek, damar endotelinde hasar riskini artırabilir. Ayrıca, bu yöntem cerrahi süresini uzatmakta ve buna bağlı olarak anestezi komplikasyonları, postoperatif enfeksiyon riski ve hastanede yatış süresinin uzaması gibi olumsuzlukları beraberinde getirmektedir. Bu nedenlerle iskemik ön koşullandırma klinik pratikte geniş bir kullanım alanı bulamamıştır (170). Son yıllarda kök hücre tedavileri, özellikle adipöz doku kökenli kök hücreler (ADSC), iskemik doku iyileşmesinde umut vaat etmektedir. ADSC'lerin pro-anjiyojenik ve anti-enflamatuar etkileri sayesinde doku canlılığı artmış ve iskemik hasarın azaltılabileceği gösterilmiştir (98). Fakat; flep cerrahisi alanında kök hücre tedavilerine ait veriler kısıtlı olup, standart klinik uygulamalarda yer almamaktadır. Bu sebeplerden dolayı, bu çalışmada, İRH'yi önleyebilme amaçlı kolay uygulanabilme özelliği ön planda tutularak bir farmakolojik yöntem tercih edilmiştir.

Cerrahi geciktirme ve koşullandırma yöntemlerinin zaman alıcı ve maliyetli olması, flep cerrahisinde İRH'yi azaltmak ve flep viabilitesini artırmak amacıyla farmakolojik yaklaşımlara yönelik araştırmaları arttırmıştır. Genellikle farmakolojik tedavinin temeli, ROS ve diğer inflamatuar modülatörlerin üretimini önlemek veya etkilerini azaltmak, hücre korumasını veya yeni damar oluşumunu sağlayan sinyal yollarını indüklemek üzerine kurulmuştur. Çalışmaların büyük bir kısmı antioksidanlar, NO donörleri ve türevleri, statinler, anti-lökosit tedavileri ve gen tedavileri üzerinde yoğunlaşmaktadır (4). Bu farmakolojik ajanlar, iskemi oluşmadan önce, sırasında veya sonrasında uygulanabilmektedir (101). Nitrit, hipoksik ve asidik

koşullarda nitrik oksite dönüşebilme potansiyeline sahiptir. Bu durum özellikle iskemik dönemlerde NO düzeylerini artırarak doku perfüzyonunun korumasını desteklemektedir. Wang ve arkadaşlarının çalışmasında, iskemik kasın dolaşımına düşük doz sodyum nitrit verilmesi, reperfüzyon kaynaklı mitokondriyal disfonksiyonları ve dokusal değişiklikleri önemli ölçüde azaltmıştır (103). Statinlerin ise anti-inflamatuar ve antioksidan etkileri ile İRH'yi baskılayarak anjiyogenezi desteklediği gösterilmiştir. Dillon ve Cowled'in çalışmalarında, pravastatin ve simvastatin ile tedavinin iskemik fleplerde oksidatif hasarı ve nötrofil infiltrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (104,105). Anti-lökosit tedavisi ise, inflamatuar mediyatör salınımının veya reseptör etkileşiminin inhibisyonuna, lökosit adezyon molekülü sentezine veya lökosit-endotel adhezyonuna odaklanmıştır. Gideroğlu ve arkadaşları, bir lökotrien reseptör antagonisti olan montelukast sodyum uygulaması sonrası nekroz oranlarında anlamlı düşüş saptamışlardır (16). Aynı şekilde, büyüme faktörleri (VEGF, FGF ve PDGF) kapiller yoğunluğu artırarak flep viabilitesini iyileştirmiş, rekombinant formlarının kullanımıyla flep nekroz oranlarının azaldığı gösterilmiştir (108–110). Bu çalışmaların çoğu olumlu sonuçlar göstermiştir, ancak diğer araştırma grupları tarafından geniş ölçekli takip raporları bulunmamaktadır. Bu nedenle, deneysel araştırmalarla sınırlı kalmıştır.

İRH'ye karşı kullanılan bir diğer popüler farmakolojik yöntem, antioksidan tedavidir. Antioksidan tedavi, sadece plastik cerrahi alanında değil, diğer tıp dallarında da son yıllarda popüler bir araştırma konusu haline gelmiştir. Antioksidanlar, enzimatik veya enzimatik olmayan yollarla, serbest radikalleri etkisiz hale getirerek hücreleri koruyan moleküllerdir. Oksidatif stres koşullarında, endojen antioksidanların yetersiz kalması durumunda hücresel fonksiyonların korunabilmesi için eksojen antioksidan desteği gerekebilir. Literatürde, eksojen antioksidanların ROS'a karşı ek bir savunma mekanizması oluşturduğu vurgulanmaktadır (5). Flep cerrahisinde ise İRH sonucunda artan ROS üretimi, vücudun doğal antioksidan kapasitesini aşabilmektedir. Bu nedenle, eksojen antioksidanların sağladığı bu ikincil savunma mekanizması, doku hasarını önlemede kritik rol oynamaktadır(112). Yukarda bahsedilen sebeplerden dolayı, bugüne kadar, deneysel hayvan modellerinde İRH'ye karşı birçok antioksidan maddenin etkinliği araştırılmıştır. Literatürde yer alan çalışmalarda, Vitamin C(6,7), Vitamin E(8), Melatonin(9), Vitamin A(174), alfa lipoik asit (175), Fucoidin(10), Koenzim Q10(11), Kafeik asit fenilester(12), taurine(13),

ekstrasellüler süperoksit dismutaz(14), çinko(15), D-allose(18), Sulfatid(19), , üzüm çekirdeği ekstresi(21), Likopen(6) gibi tekil antioksidan maddelerin veya Proxeed plus (22) gibi kombine antioksidan tedavilerin, nekroz oranlarını azaltma, mikrodolaşımda iyileşme, süperoksit radikali üretiminin sınırlandırılması, mitokondriyal disfonksiyonun önlenmesi, metabolik bozulmaların hafifletilmesi, histolojik hasarın azalması, miyeloperoksidaz ve kreatin fosfokinaz gibi enzim aktivitelerinin düşürülmesi gibi olumlu etkiler sağladığı gösterilmiştir. Ancak, flep cerrahisinde büyük örneklem sayısına sahip, randomize ve çok merkezli klinik çalışmaların eksikliği dikkat çekmektedir. Ayrıca, tüm antioksidan tedavi çalışmalarında sadece etken maddelere odaklanılmıştır. Güncel deneysel çalışmalarda dışardan gözüken amaç, genellikle, flep cerrahisinde İRH'ye karşı yeni, olası etkili, antioksidan maddeleri keşfetmektir. Hali hazırda, genel geçer antioksidan özellikleri kanıtlanmış maddeler bulunurken; yeni antioksidanları keşfetmekten çok standart antioksidant tedavi programını oluşturmaya yardımcı olabilcek araştırmalara yönelmek daha mantıklı durmaktadır. Literatürde, ideal antioksidan tedavinin başlangıç zamanlamasını araştıran veya karşılaştıran bir yayın bulunmamaktadır. Etken antioksidan maddeye odaklanan çalışmalarda, antioksidanlar genellikle operasyondan 1-2 hafta önce(6,21), iskemiden hemen önce(18) veya reperfüzyondan hemen önce(7) uygulanmıştır. Çalışmamızda, melatonin, Vitamin E ve C (MEC) içeren antioksidan ön tedavinin operasyondan 1 hafta önce, iskemiden 30 dakika önce ve reperfüzyondan 30 dakika önce başlandığı gruplar karşılaştırılmıştır. Bu noktada, antioksidan ön tedavi zamanlamasını karşılaştıran çalışmamız, literatürde bir ilki teşkil edip, antioksidan ön tedavi algoritması oluşturmaya katkı sağlanması ve klinik çalışmaların önünü açmasını hedeflenmektedir.

C vitamini, insanlarda sentezlenemediği için dışarıdan alınması zorunlu olan, suda çözünen, insan fizyolojisi için kritik öneme sahip, güçlü bir non-enzimatik antioksidan moleküldür (114). Biyolojik sistemlerde en güçlü indirgeme ajanlarından biri olup, hidroksil radikali, hidrojen peroksit ve tekil oksijen gibi ROS'ları nötralize eden bir serbest radikal süpürücüsüdür. Bu özelliğini; altı karbonlu molekülündeki ikinci ve üçüncü karbonlar arasındaki çift bağdan iki elektron transferi sağlayarak gösterir (113). Bu antioksidan aktivitesi sayesinde C vitamini, serbest radikallerin proteinlerde ve lipit membranlarda neden olduğu oksidatif hasara karşı hücreleri korur ve biyolojik sistemlerde önemli bir rol oynar (115). Ayrıca, tokoferoksil radikallerini

azaltarak vitamin E'nin antioksidan formunu yeniden oluşturmakta da etkilidir. Bu süreç, serbest radikallerin neden olduğu hasardan hücre zarlarını ve hücrenin diğer membranlarını korumaya ekstra yardımcı olur (116). Bu antioksidan özelliklerinden dolayı, Vitamin C, birçok deneysel İRH çalışmasınanda kullanılmıştır. Zaccaria ve arkadaşlarının gerçekleştirdiği bir çalışmada, sıçan epigastrik ada flebi modelinde askorbik asidin etkileri incelenmiş ve askorbik asit grubunda, kontrol grubuna kıyasla daha yüksek oranlarda flep sağkalımı gözlemlenmiştir (118). Ayrıca, Georgopoulos ve arkadaşları, benzer bir deneysel modelde Vitamin C uygulaması ile birlikte daha az nekroz oranlarının görüldüğünü, nötrofil ve mast hücre sayılarının da anlamlı bir şekilde düştüğünü bildirmişlerdir (7). Anlaşılacağı üzere, Vitamin C literatürde İRH'yi önleme amaçlı kullanımı kabul görmüş, etkinliği kanıtlanmış, hatta yeni antioksidan maddelerin flep modellerinde karşılaştırmalarda kullanılan bir antioksidandır (6). Bu sebeplerden dolayı, bu çalışmada, Vitamin C 200mg/kg dozunda antioksidan ön tedavi rejiminde intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Literatürde, aynı doz ve uygulanma şekli ile yürütülmüş çalışmalar mevcuttur (8,176,177).

Vitamin E, insanlarda depolanabilen ve yağda çözünebilen bir vitamindir (120). Vitamin E'nin en belirgin biyolojik rolü, güçlü antioksidan kapasitesine dayanır. Doğadaki en etkili antioksidanlardan biri olarak kabul edilen vitamin E, fenolik hidrojen atomunu serbest radikalleri nötralize etmek için hızla transfer edebilme yeteneğine sahiptir. Bu antioksidan etkinlik, genellikle vitamin C'nin katkısıyla gerçekleşen bir yenilenme mekanizması ile desteklenir (123). Vitamin E, hücre ve organel membranlarında yer alan doymamış yağ asitlerinin oksidasyonu ve serbest radikal reaksiyonlarının yayılmasını önleyen güçlü bir zincir kırıcı antioksidan görevi görür. Bu yapısı sayesinde, hücre zarlarının lipid düzenini iyileştirir ve membranların daha sıkı, dolayısıyla daha kararlı hale gelmesini sağlar (122). Ayrıca, alfa-tokoferolün endotel hücrelerindeki yoğunluğunun artması, trombosit agregasyonunu azaltarak endotelden prostasiklin salınımını artırır. Bu etkiler, hücre adezyon molekülleri olan ICAM-1 ve VCAM-1 seviyelerindeki düşüşle ilişkilendirilmiştir (121). Bu özelliklerinden dolayı Vitamin E, plastik cerrahiyi ilgilendiren çeşitli deneysel İRH modellerinde kullanılmıştır. Bradley ve arkadaşlarının bir çalışmasında; Vitamin E'nin İRH ve NF-κB ekspresyonu üzerindeki etkisi, 4 saatlik iskemi dönemini takiben reperfüzyon sırasında bir sıçan iskelet kası modelinde incelenmiştir. İlgili çalışmada, Vitamin E'nin, İRH'yi önleyerek kas canlılığını arttırdığı ve NF-κB inhibisyonu

gösterdiği saptanmıştır (178). Benzer sonuçlar, Erkut ve arkadaşlarının çalışmasında izlenmiştir. Tavşan iskelet kası İRH modelinde yapılan araştırmada, alfa-tokoferol grubunda SOD, katalaz ve GSH-P seviyelerinin, kontrol grubuna göre daha düşük olduğu belirlenmiştir (127). Geçmiş çalışmalarda etkinliği saptanmış olan Vitamin E, çalışmamızda, antioksidan ön tedavi rejiminde 40mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Literatürde, aynı doz ve uygulama şekli seçilen hayvan deneyi çalışmaları mevcuttur (8,179).

Melatonin, pineal bezdeki pinealosit hücrelerinde serotonin üzerinden triptofan metabolizması sonucu sentezlenen ve önemli fizyolojik işlevler üstlenen bir hormondur. Küçük moleküler yapısı ve yüksek lipofilikliği sayesinde tüm biyolojik membranları geçip kan-beyin bariyerini aşarak vücutta yayılır (129). Güçlü antioksidan özelliklere sahip olan melatonin, ROS ve RNS'leri azaltarak serbest radikal süpürücü olarak doğrudan etki gösterir (140). MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığıyla süperoksit dismutaz (SOD), glutatyon peroksidaz (GSH-P) ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi antioksidan enzimlerin seviyesini artırırken (135), MT3 reseptörü üzerinden kinon redüktaz olarak kinonların elektron transferini inhibe eder ve oksidatif stresi azaltır (132). Melatonin aynı zamanda anti-inflamatuar etkilere sahiptir; IL-10'un salınımını artırıp TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretimini baskıladığı gösterilmiştir (138). Bir diğer etkisi ise; mitokondriye kolayca ulaşarak oksidatif stresi azaltması ve mitokondri kaynaklı apoptozun önlenmesinde rol oynamasıdır (140). Bu özelliklerinden dolayı, tıpkı Vitamin C ve E gibi, melatonin de çok sayıda İRH çalışmasında antioksidan tedavide tercih edilmiştir. Örneğin; Gürlek ve arkadaşlarının çalışmasında, inferior epigastrik ada flebi modelinde 12 saatlik iskemi sonrası reperfüzyon hasarı incelenmiş ve intraperitoneal melatonin uygulanan gruplarda istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha düşük nekroz oranı, MDA ve MPO seviyeleri, daha yüksek GSH seviyeleri saptanmıştır (142). Hem geçmiş çalışmalarda aksiyel flep İRH modellerinde etkisinin gösterilmesi, hem de insanlarda destek tedavide kullanılabilmesi açısından, melatonin, çalışmamızda antioksidan ön tedavi rejiminde tercih edilmiştir. Çalışmamızda melatonin, 10mg/kg dozunda intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Belirtilen doz miktarı, geçmiş çalışmalarda da birçok kez tercih edilmiştir (180–182).

Melatonin, Vitamin C ve E'nin birlikte kullanıldığı deneysel çalışmalar oldukça kısıtlıdır. Ancak literatürde, birkaç adet kombine kullanıma ait hayvan deneyi

çalışması bulunmaktadır. Örneğin, Karaöz ve arkadaşlarının çalışmasında, melatonin ve vitamin C ile E'nin, klorpirifos-etil (CE) maruziyeti sonrası akciğer dokularında oluşturduğu hasarı azalttığı gösterilmiştir. CE grubu, artmış lipid peroksidasyonu ve azalmış antioksidan enzim aktiviteleri ile oksidatif stresin belirgin etkilerine maruz kalmıştır. Melatonin ve vitamin tedavileri, bu etkileri azaltarak CE'nin akciğerlerdeki toksisitesini önemli ölçüde hafifletmiştir (183). Benzer bir nitelik taşıyan, Gültekin ve arkadaşlarının çalışmasında ise, CE maruziyeti, sıçan eritrositlerinde oksidatif stresin artmasına ve lipid peroksidasyonunun yükselmesine, ayrıca antioksidan enzim aktivitelerinin (SOD, Katalaz) azalmasına neden olmuştur. Melatonin ve vitamin E ile C tedavileri, CE'nin neden olduğu bu etkileri anlamlı düzeyde tersine çevirmiştir (184). Bahsedildiği üzere, ilgili antioksidanların kombine kullanıldığı bir flep çalışması mevcut değildir. Ancak cilt dokusunu ilgilendiren bir çalışmada, Dreher ve arkadaşları, topikal olarak uygulanan C vitamini, E vitamini ve melatoninin UV ışınlarına karşı kısa vadeli fotoprotektif etkileri in vivo olarak incelenmiştir. Tek başına uygulandıklarında vitaminler hafif koruma sağlarken, melatonin doza bağlı olarak daha güçlü bir fotoprotektif etki göstermiştir. Melatonin ve vitaminlerin kombinasyonu, özellikle birlikte uygulandıklarında, en yüksek düzeyde koruma sağlamıştır (185). Çalışmamızda, melatonin, Vitamin C ve E'nin kombine olarak antioksidan ön tedavide kullanılması, deneysel flep çalışmalarında bir ilk olmuştur. Kombine tedavide ilgili antioksidanların tercih edilmesinde birçok neden vardır. Öncelikle, bahsedildiği üzere, farklı alanlarda olsa da ilgili antioksidanların birlikte kullanılmasının çeşitli sinerjist olumlu etkileri gösterilmiştir. Ayrıca, Vitamin C'nin biyolojik sistemlerde bilinen en güçlü indirgeyici nonenzimatik antioksidanlardan biri olması ve membranlarda bulunan Vitamin E'nin serbest radikal süpürücü özelliğini sürekli yenilemesi, Vitamin E'nin insanlarda depolanabilir bir vitamin olması ve zarlarda bulunan lipidlerin peroksidasyonunu etkileyerek stabiliteyi arttırması, melatoninin ise lipofilik bir hormon olarak periferik dokulara yayılması ve hem serbest radikal süpürücü olarak doğrudan etki göstermesi hem de reseptör aracılı dolaylı antioksidan etkiler göstermesi nedeniyle MEC ön tedavisini içeren kombine kullanım tercih edilmiştir. Bunlara ek olarak, ilgili antioksidanlar, insanlarda ilaç niteliği taşımayıp destek tedavi özelliği göstermektedir. Bu nedenle, destek tedavi niteliği altında, melatonin, Vitamin C ve E insanlarda herhangi bir gereklilikte kullanılabilmektedir. Böylece, elektif flep operasyonları öncesi, ilgili antioksidan ön tedavi istenildiği zaman kullanılabilir haldedir.

Çalışmamız, iskemi-reperfüzyon (İR) oluşturulmayan ve SF enjeksiyonları yapılan pozitif kontrol grubu (KR grubu), İR oluşturulan ve SF enjeksiyonları yapılan negatif kontrol grubu (İR grubu), İR oluşturulan ve MEC tedavisi sırasıyla operasyondan 7 gün önce, iskemiden yarım saat önce ve reperfüzyondan yarım saat önce başlanan tedavi grupları (sırasıyla İ7, İY ve RY) olmak üzere 8'er sıçan içeren 5 grup üzerinden gerçekleştirilmiştir. Enjeksiyonlar tüm gruplara preoperatif 7. Günden postoperatif 7. Güne kadar devam etmiş, her gün MEC tedavisi uygulanmayan hayvanlara aynı hacimde SF enjeksiyonu yapılarak enjeksiyona bağlı stresin ve sıvı yüklenmesinin eşitlenmesi ön görülmüştür. İnferior epigastrik ada flebi modelinde iskemi süresi diğer birçok çalışmada olduğu gibi 8 saat olarak tercih edilmiştir (8,20). Ayrıca, iskemi oluşturulurken, pedikülün kendisine değil de femoral paketten dallandığı noktanın proksimali ve distali ayrı ayrı klemplenerek klempe bağlı pedikül hasarı ihtimalinin azaltılması amaçlanmıştır.

Çalışmamızda, postoperatif 7. günde ötenazi öncesi yapılan fotografik incelemede, İR uygulanan gruplar arasında en düşük nekroz oranına sahip grup %6,3 ile İ7 grubu olmuştur. İstatistiksel karşılaştırmada İ7 grubu, İR, İY ve RY gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük nekroz oranı göstermiştir. Hatta İ7 grubu ile İR uygulanmayan pozitif kontrol grubu arasında nekroz oranı açısından anlamlı fark saptanmamıştır. İY ve RY grupları ise, antioksidan ön tedavi uygulanmayan İR grubuna göre daha düşük nekroz oranlarına sahip olsalar da; istatistiksel karşılaştırmada aralarında anlamlı fark hesaplanmamıştır. Bu veriler doğrultusunda, antioksidan ön tedavi zamanlaması açısından, 7 gün önce MEC tedavisinin başlanmasının flep canlılığını arttırmada en etkili zamanlama olduğu kanısına varılmıştır. Ayrıca, MEC tedavisinin iskemiden ve reperfüzyondan yarım saat önce başlanmasının İR grubuna göre nekroz oranları açısından anlamlı fark yaratmamasının literatür ile çeliştiği fark edilmiştir. Literatürde, cerrahiden 1 saat ve reperfüzyondan yarım saat önce melatonin uygulamasının (142), reperfüzyondan 15 dakka önce Vitamin C uygulamasının (118) ve iskemiden 1 saat sonra Vitamin E uygulamasının (178) anlamlı şekilde flep canlılığını arttırdığına yönelik veriler bulunmaktadır. Ancak bu çalışmalarda, çalışmamızda olduğu gibi kombine MEC tedavisi uygulanmadığından objektif bir kıyas yapılamamaktadır.

Yapılan histopatolojik değerlendirmeler de fotoğrafik sonuçları destekler şekilde sonuçlanmıştır. Hemotoksilen eozin boyama ile nötrofil yoğunluğu ve

damarlanma azlığı skorlanmıştır. Daha önceden bahsedildiği üzere, İRH patogenezinde nötrofiller önemli bir rol oynamaktadır. İRH durumunda ortaya çıkan inflamatuar mediyatörler nedeniyle artan nötrofillerden salınan MPO, H2O2'nin HOCl'ye dönüşümünü katalize eder. HOCl ise güçlü bir sitotoksik oksidan ajandır ve doku hasarına neden olur (56). Ayrıca, oksidatif stres durumunda VEGF düzeylerinde meydana gelen düşüş, damarlanmanın azalması ile sonuçlanır. Bu sebeplerden dolayı histopatolojik incelemede, artmış nötrofil yoğunluğu ve damarlanmada azalma, artan İRH lehine değerlendirilmiştir. Yapılan skorlamada, fotoğrafik verilere göre en yüksek nekroz oranına sahip İR grubu, hem kontrol hem de MEC uygulanan gruplar ile karşılaştırıldığında anlamlı şekilde daha yüksek skor almıştır. İR uygulanan gruplar arasında en düşük nekroz oranına sahip İ7 grubu ise İR, İY ve RY grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde daha düşük skorlanmıştır. Hatta İ7 ile KR grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır. İY ve RY grupları İR grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük skorlanırken, kendi aralarında anlamlı bir fark saptanmamıştır. Böylece, fotoğrafik verilerde İY ve RY grupları İR grubuna göre nekroz oranı açısından anlamlı fark yaratmasa da, histopatolojik değerlendirmede kendi lehlerine anlamlı bir değişim göstermiştir. Bu sonuçlar doğrultusunda, preoperatif 7. Günde MEC tedavisinin başlanmasının, fleplerde histopatolojik olarak İR gelişmemiş gibi bulgular verebilmesine neden olabileceği düşünülmüştür. Erken başlanan antioksidan ön tedavinin, hem doğrudan hem de dolaylı yoldan tetiklediği antioksidan mekanizmalarla doku oksidasyonunu azalttığı, buna bağlı olarak enflamasyonun azaldığı ve normal flep fizyolojisinde olduğu gibi flep distalinde damarlanmanın arttığı ön görülmüştür.

Histopatolojik değerlendirme için alınan piyeslerde aynı zamanda Mason Trikrom ile boyama yapılıp, kollajen yapısı ve yoğunluğu skorlanmıştır. İRH durumunda doku kollajenaz aktivitesi artmaktadır ve buna bağlı olarak kolajjen yapısında bozulma meydana gelmektedir (186). Bu nedenden dolayı, çalışmamızda, denatüre kollajen yapısı ve azalmış konsantrasyonu, tıpkı Verhofstadt skorlamasında olduğu gibi, artmış İRH lehine yorumlanmıştır (169). İR uygulanan gruplar arasında en yüksek skoru İ7 grubu almıştır. İ7 grubunun İR uygulanan diğer gruplarla yapılan istatistiksel karşılaştırmasında da her karşılaştırmada İ7 grubu lehine anlamlı fark saptanmıştır. Fotoğrafik çalışmada olduğu gibi, İY ve RY gruplarının skor ortalamaları İR grubundan yüksek olsa da kendi aralarında anlamlı fark bulunmamıştır. Bu sonuçlar

doğrultusunda, 7 gün önce başlanan MEC tedavisinin diğer tedavi başlangıç zamanlamalarına göre İRH'ye karşı daha etkin bir koruma sağladığı ve böylece kollajen yapısını koruduğu kanısına varılmıştır.

Çalışmamızda, aynı zamanda, eNOS, Kaspaz-3, IL-1 beta ve VEGF'ye yönelik immünohistokimyasal değerlendirmeler yapılmıştır. eNOS, kalsiyum-kalmodulin bağımlı bir enzim olup, komşu vasküler düz kaslara parakrin sinyal olarak düşük nanomolar seviyelerde NO üretir (187). Normal fizyolojik koşullarda eNOS, endotelyal hücrelerde düşük seviyelerde üretilir ve vazodilatasyon, düz kaslarda gevşeme, lökosit adhezyonunun engellenmesi, trombosit fonksiyonları ve hücre içi sinyal iletiminde düzenleyici bir role sahiptir (188). Öte yandan, bazı araştırmalar, İRH durumunda eNOS tarından üretilen NO'nun reaktif peroksinitrit ve hidroksil radikalleri oluşturarak endotelyal hücre membranlarında oksidatif hasara yol açabileceğini, dokuda inflamasyon ve ödemi artırabileceğini ve nötrofillerin diapedez ve degranülasyonunu teşvik edebileceğini öne sürmektedir (189,190). Qi ve arkadaşları, NO'nun eNOS izoformundan üretildiğinde flep için faydalı olduğunu, ancak miyeloid, endotelyal ve iskelet kası hücrelerinde bir diğer izoform olan iNOS tarafından üretildiğinde enflamatuar durumlarda zararlı olabileceğini belirtmektedir (191). Diğer taraftan Kane ve arkadaşları, mast hücrelerde bulunan iNOS'un, yara iyileşmesi ile ilgili anjiyogenezi diğer anjiyojenik faktörleri indükleyerek desteklediğini, eNOS'un ise bu sürece zararlı olabileceğini savunmuştur (192). Anjiyogenez üzerindeki etkilerin, iNOS ve eNOS'un spesifik etkilerinden ziyade hipoksi durumu ve ilişkili hücre sinyal moleküllerinin düzenine daha fazla bağlı olduğu düşünülmektedir (187). Literatürde eNOS'un, İRH durumunda flep canlılığına olan etkisi tartışmalı olsa da, oksidatif stres durumunda eNOS seviyelerinin arttığı ortak kanı dahilindedir. Bu nedenle, eNOS, çalışmamızda oksidatif stres prediktörü lehine değerlendirilmiştir. Gruplar arasında yapılan karşılatırmada, en yüksek eNOS seviyesi İR grubunda skorlanmıştır. MEC ön tedavisi uygulanan tüm gruplar ise İR grubuna göre anlamlı şekilde daha düşük eNOS seviyesine sahip olmuştur. MEC ön tedavisi uygulanan gruplar arasında ise İ7 grubu en düşük skora sahip olurken, çoklu karşılaştırmada sadece İ7 ve İY grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır. İlgili veriler doğrultusunda, kombine MEC tedavisinin ROS'u dolaylı veya doğrudan yollarla azalttığı, bu sayede oksidatif stresin İR grubuna göre mukayeseli azaldığı ve böylece eNOS üretiminin azaldığı düşünülmüştür. Ayrıca, MEC grupları arasında

sadece İ7 ve İY grupları arasında anlamlı fark olsa da, en düşük eNOS seviyesi ortalamasına sahip grubun İ7 grubu olması nedeniyle, 7 gün önce başlanan antioksidan ön tedavinin oksidatif stresi azaltmada daha etkili olabileceği yönünde yorumlanmıştır.

İRH durumunda, hücre içi ve mitokondriyal Ca2+ konsantrasyon artışı meydana gelir. Bu durum, mitokondriyal permeabilite transizyon porlarının açılmasına neden olarak sitozole proapoptik bir madde olan sitokrom c kaçışına neden olur. Sitokrom c artışı da, kaspaz bağlımlı mekanizmaları aktive ederek hücre apoptozuna neden olur (4). Kaspaz-3 ise, bu süreçte apoptozda rol oynayan proteazlardan birisidir (193). Sümer ve arkadaşlarının bir çalışmasında, kaspaz inhibitörü ile ön tedavi sonrası sıçan fasyakütan fleplerinin kritik primer iskemi süresinde anlamlı bir artış saptanması, apoptozun rolünü doğrulamıştır (194). Çalışmamızda, Kaspaz-3 apoptoz belirteci olarak kabul edilerek, seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmıştır. Yapılan h-skorlamasında en yüksek Kaspaz-3 seviyesi İR grubunda, en düşük seviye ise İR uygulanan gruplar arasında İ7 grubunda saptanmıştır. MEC uygulanan tüm gruplar, İR grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha düşük Kaspaz-3 skoru elde etmiştir. Ayrıca, İ7 ve İY gruplarının KR grubu ile karşılaştırılmasında anlamlı fark saptanmamıştır. MEC uygulanan gruplar arasında ise sadece İ7 grubu ile RY grubu arasında İ7 grubu lehine istatistiksel anlamlı fark bulunmuştur. Bu sonuçlar neticesinde, 7 gün önceden MEC tedavisinin başlanmasının apoptozu engellemede de daha etkili olabileceği düşünülmüştür. Önceden başlanan antioksidan tedavinin oksidatif stres yükünü azaltarak, hücre ve organel membranlarının permeabilitesinin azaltması ve stabilitesini arttırması, bu etkinin sebebi olarak ön görülmüştür.

İR sırasında üretilen ROS, oksitleyici özellikleri sayesinde lipid peroksidasyonu oluşturur ve hücre zarlarına doğrudan zarar verir. Bunun sonucunda makrofajlar tarafından İL-1 beta salınımı meydana gelir. Transendotelyal lökosit göçü artar ve böylece doku hasarı veren enzimlerin salınımı ile ikincil hasarlar oluşur(2). Bu nedenle, İL-1 beta, İRH'ye bağlı enflamasyon belirteci olarak çalışmamızda kullanılmıştır. Yapılan immünohistokimyasal değerlendirmede; en yüksek İL-1 beta seviyesi İR grubunda bulunmuştur. MEC uygulanan gruplarda ise İL-1 beta seviyesi, İR grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde daha düşük saptanmıştır. En düşük İL-1 beta seviyesi İ7 grubunda bulunsa da, MEC uygulanan grupların

karşılaştırılmasında sadece İ7 grubu ile RY grubu arasında anlamlı fark saptanmıştır. Böylece, 7 gün önce MEC tedavisine başlanmanın da İRH'ye bağlı enflamasyonu azaltmada etkili olduğu kanısına varılmıştır. Daha önceki çalışmalarda, Zhao ve arkadaşları, sıçan fokal serebral iskemi modelinde, melatoninin TLR4/NF-κB sinyal yolunu inhibe ederek IL-1β ekspresyonunu baskıladığını tespit etmiştir (138). Hem melatoninin bu özelliği nedeniyle, hem de Vitamin C ve E'nin güçlü süpürücü etkisi sonucu ROS'ları indirgemesi nedeniyle enflamasyonun MEC uygulanan gruplarda baskılandığı düşünülmüştür.

Doku iskemisi varlığında, FGF ve VEGF gibi büyüme faktörlerinin salınımı, endotelyal hücrelerin ve endotelyal progenitor hücrelerin proliferasyonunu ve yeni kapillerlerin oluşumunu uyarır. Literatürde, sıçan epigastrik ada flebi modelinde VEGF165'in lokal intraarteriyal enjeksiyonu (107) ve TRAM flebi modelinde 20 gün önce rektus abdominis kasına VEGF165 enjeksiyonu (108) ile azalmış flep nekroz oranları saptanmıştır. Çalışmamızda, VEGF seviyeleri gruplar arasında karşılaştırılmış ve ilgili parametre yeni damarlanma belirteci olarak kullanılmıştır. Yapılan değerlendirmede; İ7 grubu, İR uygulanan gruplar arasında, VEGF seviye ortalaması en yüksek grup olarak hesaplanmıştır. KR grubu ise, diğer tüm gruplara göre istatistiksel anlamlı yükseklik göstermiştir. İR grubu ile MEC uygulanan gruplarla karşılaştırıldığında ise, sadece İ7 grubu lehine anlamlı fark bulunmuştur. MEC grupları arasında yapılan karşılaştırmada ise en yüksek ortalamaya sahip grup İ7 grubu olsa da; istatistiksel anlamlı fark hesaplanmamıştır. Bu bulguların, Hemotoksilen eozin boyaması sonucu yapılan damarlanma azlığı skorlaması ile uyumlu olduğu gözlenmiştir. Daha önce bahsedildiği üzere, bu durum, 7 gün önce başlanan antioksidan kombine ön tedavinin İRH'yi minimize etmesi ve bu sayede normal flep fizyolojisinde olduğu gibi VEGF düzeylerinin ve flep damarlanmasının artması ile açıklanabilmektedir. Ayrıca, Huang ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada, melatoninin, sıçanlarda kaldırılan çok bölgeli perforatör fleplerinin sağ kalımına etkisi araştırılmıştır. İlgili çalışmada; melatonin uygulanan grupta kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak daha fazla VEGF ekspresyonu izlenmiştir (195). Literatürdeki bir diğer tartışmalı konu ise, İRH durumunda VEGF ekspresyonunun nasıl etkilendiğidir. Bu konuda kısıtlı çalışma bulunmaktadır. Erdmann ve arkadaşlarının deneysel araştırmasında, domuz latissimus dorsi kas deri flebi modelinde, İR ve kontrol grupları arasındaki VEGF ekspresyonu seviyeleri

karşılaştırılmıştır. Kas dokusunda ve cilt adası dokusunun distalinde VEGF ekspresyonu açısından anlamlı fark bulunmazken, cilt adası proksimalinde ise İR grubu lehine artış saptanmıştır (196). Çalışmamızda ise, VEGF seviyeleri, KR grubunda İR grubuna göre daha yüksek bulunmuştur.

Biyolojik sistemlerde serbest radikal-antioksidan dengesini değerlendirmek için en sık kullanılan stratejilerden biri total antioksidan kapasitenin (TAC) belirlenmesidir. Kimyasal olarak, TAC değerlendirilmesi genellikle oksitlenebilir bir substratın (çalışmamızda, kan plazması) bir oksidan ile karşı karşıya bırakılmasına dayanır. Bu işlem, bir antioksidan varlığında veya yokluğunda maksimum oksidasyon seviyesini elde etmek amacıyla yapılır(143). TAC'ı doğrudan ölçen testler, bir maddenin oksidasyonunu inhibe etme etkisine dayanır. En sık kullanılan direkt testlerden biri, Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi testidir. Çalışmamızda da bu test tercih edilmiştir. Trolox (6-hidroksi-2,5,7,8-tetrametilkroman-2-karboksilik asit), suda çözünebilen bir E vitamini analogudur (148). Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi testi, 2,2′-azinobis (ABTS) radikal katyonunun absorpsiyon spektrumunun antioksidanlar tarafından inhibisyonuna dayanır. Bu testte, potasyum persülfat ile ABTS'nin oksidasyonu sonucu oluşan ABTS kromoforu, hidrofilik ve lipofilik bileşiklere uygulanabilen bir dekolorizasyon testiyle ölçülür. Farklı ekstrakt konsantrasyonları, 1 ml ABTS çözeltisi ile karıştırıldıktan yaklaşık 10 dakika sonra seyreltilir ve absorbans ölçülür. E vitamini analoğu olan suda çözünebilen Trolox ise, referans standart olarak kullanılır (197). Çalışmamızda, postoperatif birinci gün kuyruk veninden alınan kan örneklerinde ve postoperatif yedinci günde ötenazi öncesi alınan intrakardiyak kan örneklerinde, gruplar arasındaki karşılaştırmada istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Grupların kendi içerisinde postoperatif birinci günden yedinci güne TAC değerlerinin yükselişi karşılaştırıldığında, KR,İ7 ve İY gruplarında istatistiksel anlamlı yükseliş saptanmıştır. İR sürecinden geçen gruplar arasında sadece MEC uygulaması yapılan grupların (İ7 ve İY) postoperatif 7. Günde anlamlı yükseliş göstermesinden dolayı, MEC ile antioksidan ön tedavinin TAC seviyelerinin düzelme hızını olumlu yönde etkilemiş olabileceği ön görülmüştür. Ayrıca; MEC uygulaması yapılan gruplardan sadece RY grubunda, TAC değerinde istatistiksel anlamlı olarak yükseliş saptanmamıştır. Aynı zamanda, yapılan Shapiro Wilk normal dağılım testlerinde, sadece RY grubunda normal dağılım bulunmamıştır. Bu nedenle, RY

grubu için yapılan TAC değeri karşılaştırmasının diğer gruplara göre daha güvensiz olduğu düşünülmüştür.

TAC testleri, basit kimyasal sistemlerde daha somut sonuçlar verebilirken; organizmalar gibi daha karmaşık koşullarda kimyasal ve deneysel tanımlar farklılık gösterir (146). TAC testleri, bir kimyasal bileşiğin bir kimyasal sistemin oksidasyonunu önleme yeteneği ile bu bileşiğin in vivo bir antioksidan olma ve sağlık yararları sağlama potansiyeli arasındaki karmaşık yolda rol oynayan çeşitli faktörleri dikkate almaz. Bu durum, enzimler, sinyal molekülleri, membran bileşenleri gibi çeşitli faktörlerin rol oynadığı karmaşık biyolojik sistemlerde özellikle önemlidir; çünkü bu bileşenlerin oluşturduğu antioksidan savunma ağı herhangi bir TAC testi ile tam olarak değerlendirilemez (147). Bu nedenlerden dolayı, çalışmamızda, postoperatif birinci ve postoperatif yedinci gün alınan kan örneklerinde, gruplar arasındaki karşılaştırmada istatistiksel anlamlı fark saptanmamış olabilir. Ayrıca, van den Heuvel ve arkadaşlarının yaptığı bir klinik araştırmada, insan derin inferior epigastrik perforatör fleplerinden cilt biyopsileri alınmış ve Trolox eşdeğer antioksidan kapasitesi testi ile TAC seviyeleri ölçülmüştür. Sonuç olarak; reperfüzyondan 1 saat sonra TAC konsantrasyonunda belirgin bir azalma gözlendiği, takip eden saatte TAC konsantrasyonlarının iyileşme gösterdiği ve reperfüzyondan 2 saat sonra anlamlı bir artış kaydedildiği saptanmıştır. Bu çalışmadan yola çıkarak, çalışmamızda postoperatif 24. Saatte TAC ölçümü için kan örneğinin alınmasının ve sıçanların insanlara göre daha hızlı bir metabolizmaya sahip olmasının, gruplar arasında anlamlı bir fark oluşmamasına neden olduğu düşünülmüştür. Başka bir deneysel çalışmada ise, Bozkurt ve arkadaşları, rektus abdominis kas deri flebi İR modelinde postoperatif 2. haftada alınan kan örneklerinde TAC seviyelerini değerlendirmişlerdir. Vitamin C uygulaması yapılan grubun TAC seviyesi, kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı olarak yüksek bulunmuştur. İlgili çalışmanın sonuçları ise, deneysel metodlar tam olarak uyuşmasa da, çalışmamız ile çelişmektedir.

Çalışmamızda, postoperatif 7. günde ötenazi öncesi biyokimyasal incelemeler için tam kat doku biyopsileri alınmıştır. İlgili biyopsi materyallerinde; antioksidan bir enzim olan SOD, indirgeyici bir molekül olan GSH, oksitleyici bir enzim olan MPO, lipid peroksidasyonu ürünü olan MDA ve protein oksidasyonu ürünü olan AOPP seviyeleri incelenmiştir. Ancak; fotoğrafik ve histopatolojik inceleme sonuçlarının

aksine hiçbir biyokimyasal parametrede gruplar arası istatistiksel anlamlı fark saptanmamıştır. Bu durum, biyokimyasal incelemeler için doku biyopsilerinin 7. günde alınmış olması ile açıklanabilir. Literatürdeki geçmiş benzer modelde yapılan çalışmalara bakıldığında; Gürlek ve arkadaşlarının, melatoninin inferior epigastrik ada flebi İRH modeli üzerindeki etkisini araştırırken MPO,MDA ve GSH doku seviyelerini açısından reperfüzyondan sonraki 24. saatte doku örneklerini aldığı görülmektedir (142). Aynı zamanda, Çetin ve arkadaşları, Fucoidin'in etkilerini araştırırken MDA ve MPO incelemesi için reperfüzyondan sonraki 24. saatte doku biyopsisi almışlardır (10). Bir diğer çalışmada; Aydoğan ve arkadaşları; kafeikasitfenilesterin etkilerini araştırırken MDA, SOD, GSH ve NO incelemeleri açısından reperfüzyondan sonraki 12. saatte doku örneği almayı tercih etmişlerdir (12). Benzer çalışmalarda; Gideroğlu ve arakadaşları doku biyopsilerini reperfüzyondan sonraki 12. Ve 24. saatte alırken (16), Muneuchi ve arkadaşları ise reperfüzyondan sonraki 8. saati tercih etmişlerdir (18). Bu çalışmalarda biyokimyasal incelemeler için doku örneklerinin erken dönemde alınmasının nedeni, biyokimyasal parametrelerin akut dönemde değişmesi olabilir. Çalışmamızda doku örneklerinin 7. Günde alınması, ilgili dönemde nekrozun oturmuş olup biyopsilerin canlı flep dokusundan alınması, İRH ile birlikte gelişen biyokimyasal değişikliklerin hızlı sıçan metabolizması sonucu hızlı düzelme ihtimali nedeniyle, ilgili parametreler açısından anlamlı fark saptanmadığı düşünülmüştür. Çalışmamızda erken dönemde doku örneği alınmamasının çeşitli nedenleri mevcuttur. Hayvanlara ek stres faktörü yüklenmesinden kaçınılması, flep içerisinden alınacak tam kat doku biyopsisinin flep dolaşımını olumsuz etkileme ihtimali ve flep distaliden daha erken doku örneği alınması için daha uzun bir flep tasarlanması durumunda, flep distalinde random pattern dolaşım gelişme ihtimali, bu nedenler arasındadır.

Fotoğrafik, histopatolojik ve immünohistokimyasal incelemeler sonucunda, 7 gün önceden antioksidan ön tedaviye başlamanın İRH'yi engellemede en etkili zamanlama olduğu kanısına varılmıştır. İskemiden veya reperfüzyondan yarım saat önce antioksidan ön tedaviye başlamanın ise, bazı histopatolojik ve immünohistokimyasal parametrelerde İR grubuna göre anlamlı iyileşmeler sağladığı gösterilse de, kendi aralarında hiçbir parametrede anlamlı fark saptanmamıştır. Bir destek tedavisinin başlangıç zamanlamasının, çalışmamızın ana konusunu oluşturması nedeniyle, kullanılan maddelerin farmakokinetiği ve farmakodinamiği önem teşkil

etmektedir. Ancak; Vitamin C, Vitamin E ve melatoninin sıçanlardaki farmakokinetiği hakkında literatürde kısıtlı bilgi bulunmaktadır. Eski zamanlı çalışmalarda, Vitamin C'nin sıçanlardaki yarılanma ömrünün 3,6 ila 4,1 gün arasında olduğu iletilmiştir (198,199). Bu bilgiden yola çıkarak, 7 gün önceden Vitamin C ön tedavisinin başlanmasının, reperfüzyon sırası ve sonrasında Vitamin C konsantrasyonunun daha yüksek olmasına ve buna bağlı olarak da daha güçlü bir serbest radikal süpürücü etki göstermesine neden olabileceği varsayılmıştır. Bu süreç içerisinde, Vitamin C'nin Vitamin E'yi yenileme özelliği sayesinde (116), membranlarda Vitamin E konsantrasyonunun artmasının da sağlanacağı düşünülmüştür. Vitamin E'nin farmakokinetiği hakkındaki sayılı çalışmalardan biri olan Liu ve arkadaşlarının çalışmasında, farklı tokoferol izoformlarının yarılanma ömürleri 4,3 ile 6,4 saat olarak hesaplanmıştır. Vitamin C kadar uzun yarılanma ömrüne sahip olmasa da, Vitamin E tedavisi alan sıçanlarda Vitamin E'nin dokularda depolanabildiği gösterilmiştir (200). Bu nedenle, 7 gün önce başlanan Vitamin E ön tedavisi ile, reperfüzyon sırasında ve sonrasında membranlarda Vitamin E konsantrasyonunun daha yüksek olarak daha güçlü bir stabilite sağlayabileceği ve endotel hücrelerindeki yoğunluğunun artarak trombosit agregasyonunu azaltabileceği ve endotelden prostasiklin salınımını arttırabileceği ön görülmüştür (117). Son olarak, Yeleswaram ve arkadaşlarının çalışmasında, ekzojen olarak verilen melatoninin sıçanlardaki yarı ömrünün 19,8 dakika olduğu ve yüksek lipofilik özelliği sayesinde tüm vücuda yayılabildiği belirtilmiştir (201). Melatonin hızlı metabolize olsa da, daha önce bahsedildiği üzere, direkt antioksidan etkisi dışında reseptör aracılı dolaylı antioksidan etkiler de göstermektedir. Melatoninin 7 gün önceden uygulanmaya başlanmasıyla birlikte, MT1 ve MT2 reseptörleri aracılığıyla sağladığı SOD, GSH-P ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz gibi antioksidan enzimlerin sentezinin, MT3 reseptörü üzerinden kinon redüktaz olarak kinonların elektron transferini inhibe edici etkisinin, IL-10'un salınımının, TNF-α, IL-6 ve IL-1β gibi pro-inflamatuar sitokinlerin üretiminin baskılanmasının kümülatif ve additif bir şekilde artmış olabileceği düşünülmüştür.

Klinik açıdan bakıldığında, çoğu plastik ve rekonstrüktif cerrah, İRH'yi engelleme amaçlı, teknik zorluklar nedeniyle iskemik ön koşullandırma tekniğinin rutin kullanımından kaçınmaktadır. Bu yöntemin yerine geçecek farmakolojik bir ajan ve algoritma arayışı devam etmektedir. Vitamin C, E ve melatonin insanlarda ilaç niteliği taşımayıp, destek tedavisi olarak verilebilen antioksidanlardır. Özellikle, planlı

elektif serbest flep operasyonlarından önce, hastaların operasyona hazırlık sürecinde, ilgili antioksidanların hastalara kombine şekilde uygulanması, kümülatif ve sinerjist olumlu etkiler gösterebilir. Çalışmamızda bu olumlu etkiler deneysel olarak gösterilse de, standart bir antioksidan ön tedavi algoritması için klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. SONUÇ

Bu çalışma, sıçan inferior epigastrik ada flebi modelinde, farklı antioksidan ön tedavi başlangıç zamanlamalarının, İRH üzerine etkisini incelemiştir. Fotoğrafik, histopatolojik ve immünohistokimyasal parametrelere bakıldığında, operasyon gününden 7 gün önce kombine antioksidan tedaviye başlamanın, İRH'yi en çok azaltan ve flep canlılığını en çok arttıran zamanlama olduğu saptanmıştır. Ancak ; biyokimyasal parametrelere bakıldığında, kombine antioksidan ön tedavi uygulanan gruplarda postoperatif 1. Günden 7. Güne dek TAC değerinde oluşan istatistiksel anlamlı artış dışında, gruplar arası anlamlı fark bulunmamıştır. İskemiden ve reperfüzyondan yarım saat önce ön antioksidan tedavi uygulanan gruplar ise, bazı histopatolojik ve immünohistokimyasal parametreler açısından negatif kontrol grubuna göre istatistiksel anlamlı sonuçlar sunsa da, flep viabilitesi açısından anlamlı bir etkinlik göstermemiştir. TAC değerleri arasında anlamlı fark olmasa da, canlı organizmalarda mevcut olan ek enzimsel ve dolaylı antioksidan mekanizmalar göz önünde bulundurularak, 7 gün önce antioksidan ön tedaviye başlanmasının kümülatif ve additif antioksidan etkiler sağladığı ve İRH'yi daha etkin bir şekilde engellediği varsayılmıştır. Bu sonuçlardan yola çıkılarak, destek tedavisi niteliği taşıyan antioksidan ön tedavinin, özellikle serbest flep operasyonları öncesi, hasta hazırlık sürecinde, kolaylıkla uygulanıp, İRH durumunda flep viabilitesinin arttıralabileceği ön görülmüştür. Ayrıca, bu çalışmanın, flep cerrahisi öncesi standart bir antioksidan tedavi algoritması oluşturulmasına katkı sağladığı ve bu konu hakkındaki klinik çalışmaların önünü açtığı düşünülmüştür.

7. KAYNAKLAR

1. Chung K. Grabb and Smith's plastic surgery. Lippincott Williams & Wilkins; 2019.
2. Gurtner GC, Neligan PC. Plastic surgery E-book. Vol. volume 1 principles. Elsevier Health Sciences; 2017.
3. van den Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RRWJ. Review: ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. Vol. 62, Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 2009. p. 721–6.
4. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. Plast Reconstr Surg. 2011 Dec;128(6).
5. Bozkurt M, Sezgic M, Karakol P, Uslu C, Balikci T. The Effect of Antioxidants on Ischemia-Reperfusion Injury in Flap Surgery. In: Antioxidants. IntechOpen; 2019.
6. Bozkurt M, Kapi E, Kulahci Y, Gedik E, Ozekinci S, Isik FB, et al. Antioxidant support in composite musculo-adipose-fasciocutaneous flap applications: An experimental study. J Plast Surg Hand Surg. 2014;48(1):44–50.
7. Georgopoulos S, Mastorakos D, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Arkadopoulos N, Kannas D, et al. Hydroxyzine, cimetidine and vitamin C in reducing skin flap necrosis in ischemia-reperfusion injury in rats. A comparative study. 2012.
8. Tomur A, Etlik O, Gundogan N. Hyperbaric oxygenation and antioxidant vitamin combination reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin-flap model hbo and antioxidant vitamins reduce ischemia-reperfusion injury in rat model. 2005;
9. Gurlek A, Celik M, Parlakpinar H, Aydogan H, Bay-Karabulut A. The protective effect of melatonin on ischemia-reperfusion injury in the groin (inferior epigastric) flap model in rats. J Pineal Res. 2006 May;40(4):312–7.
10. Aydan Köse A, Aral nç, Çolak Ö, Erçel kun, Karabag Y, Özyilmaz M, et al. Protective Effect of Fucoidin (a Neutrophil Rolling Inhibitor) on Ischemia Reperfusion Injury: Experimental Study in Rat Epigastric Island Flaps. 2001;
11. Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, Sargin M, Aydin A, Eken A, et al. Protective Effects of Antioxidant Medications on Limb Ischemia Reperfusion Injury. Journal of Surgical Research. 2007 May 15;139(2):274–9.
12. Aydogan H, Gurlek A, Parlakpinar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, et al. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 2007 May;60(5):563–8.
13. Kingston R, Kelly CJ, Murray P. The Therapeutic Role of Taurine in Ischaemia-Reperfusion Injury. Vol. 10, Current Pharmaceutical Design. 2004.
14. Park JW, Qi WN, Cai Y, Zelko I, Liu JQ, Chen LE, et al. Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. Am J Physiol Heart Circ Physiol [Internet]. 2005;289:181–7. Available from: www.ajpheart.org
15. Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U. Ischemia-Reperfusion Injury in Rat Skeletal Muscle is Attenuated by Zinc Aspartate. Journal of Surgical Research. 2007 Jan;137(1):109–16.
16. Gideroglu K, Yilmaz F, Aksoy F, Bugdayci G, Saglam I, Yimaz F. Montelukast Protects Axial Pattern Rat Skin Flaps Against

Ischemia/Reperfusion Injury. Journal of Surgical Research. 2009 Dec;157(2):181–6.
17. Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y. Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. Vol. 44, British Journal of Plastic Surgery. 1991.
18. Muneuchi G, Hossain A, Yamaguchi F, Ueno M, Tanaka Y, Suzuki S, et al. The rare sugar D-allose has a reducing effect against ischemia-reperfusion injury on the rat abdominal skin island flap model. Journal of Surgical Research. 2013 Aug;183(2):976–81.
19. Ueda K, Nozawa M, Miyasaka M, Akamatsu J, Tajima S. Sulfatide Protects Rat Skin Flaps against Ischemia±Reperfusion Injury 1,2. 1998.
20. Mittermayr R, Valentini D, Fitzal F, Hallstro S, Gasser H, Redl H. Young Investigator Award Protective effect of a novel NO-donor on ischemia/ reperfusion injury in a rat epigastric flap model.
21. Karaaslan O, Ulusoy MG, Kankaya Y, Tiftikcioglu YO, Kocer U, Kankaya D, et al. Protective effect of grape seed extract against ischaemia/reperfusion injury in a rat epigastricflap model. Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery. 2010 Apr;63(4):705–10.
22. Dogan R, Metin Guler E, Kocyigit A, Bayindir N, Esrefoglu M, Mirasoglu BO, et al. Comparison of the efficacy of multiple antioxidant and hyperbaric oxygen treatments in the prevention of ischemia and necrosis of local random McFarlane skin flap. J Tissue Viability. 2021 May 1;30(2):196–206.
23. Janis JE, editor. Essentials of Plastic Surgery. CRC Press; 2014.
24. Yoshida-Amano Y, Nomura T, Sugiyama Y, Iwata K, Higaki Y, Tanahashi M. Dry skin conditions are related to the recovery rate of skin temperature after cold stress rather than to blood flow. Int J Dermatol. 2017 Feb 4;56(2):176–83.
25. Gaboriau HP, Murakami CS. Skin anatomy and flap physiology. Otolaryngol Clin North Am. 2001 Jun;34(3):555–69.
26. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg. 1987 Mar;40(2):113–41.
27. Taylor GI. The angiosomes of the body and their supply to perforator flaps. Clin Plast Surg. 2003 Jul;30(3):331–42.
28. Saint-Cyr M, Wong C, Schaverien M, Mojallal A, Rohrich RJ. The Perforasome Theory: Vascular Anatomy and Clinical Implications. Plast Reconstr Surg. 2009 Nov;124(5):1529–44.
29. Mitchell CD. Plastic Surgery, 2nd ed. Ann Surg. 2007 Jul;246(1):159.
30. Milton SH. Pedicled skin-flaps: The fallacy of the length: Width ratio. British Journal of Surgery. 2005 Dec 7;57(7):502–8.
31. Zhou X, Wang W, Zhou Y, Zuo C, Mo Y, Luo Y, et al. General Remarks. In 2018. p. 1–64.
32. Stell PM. The viability of skin flaps. Ann R Coll Surg Engl. 1977 May;59(3):236–41.
33. Timmons MJ. The Vascular Basis of the Radial Forearm Flap. Plast Reconstr Surg. 1986 Jan;77(1):80.
34. Taylor GI, Daniel RK. The Free Flap: Composite Tissue Transfer by Vascular Anastomosis1. Australian and New Zealand Journal of Surgery. 1973 Jul 14;43(1):1–3.

35. Morris SF, Tang M, Almutari K, Geddes C, Yang D. The Anatomic Basis of Perforator Flaps. Clin Plast Surg. 2010 Oct;37(4):553–70.
36. Geddes CR, Morris SF, Neligan PC. Perforator Flaps: Evolution, Classification, and Applications. Ann Plast Surg. 2003 Jan;50(1):90–9.
37. Morrison E, Morrison WAJ. Basic Skin Flaps and Blood Supply. In: Plastic Surgery - Principles and Practice. Elsevier; 2022. p. 15–26.
38. Yan H, Brooks D, Ladner R, Jackson WD, Gao W, Angel MF. Arterialized venous flaps: A review of the literature. Microsurgery. 2010 Sep 17;30(6):472–8.
39. Tan O, Atik B, Bekerecioglu M. Supercharged reverse-flow sural flap: A new modification increasing the reliability of the flap. Microsurgery. 2005;25(1):36–43.
40. Scuderi GR, Nett MP, Norambuena GA, Cooper HJ, Lerman O, Karanetz I. Management of Soft Tissue Defects. In: Complex Cases in Total Knee Arthroplasty. Cham: Springer International Publishing; 2018. p. 387–414.
41. Ahmad J. Michigan Manual of Plastic Surgery. Aesthet Surg J. 2016 Jan;36(1):NP45–6.
42. Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: experimental and clinical correlation. Plast Reconstr Surg. 1981 Feb;67(2):177–87.
43. Im JH, Park MS, Lee JY. Free Functioning Muscle Transfer in Brachial Plexus Injury. Journal of the Korean Society for Surgery of the Hand. 2017;22(3):165.
44. Lamberty BGH, Cormack GC. Fasciocutaneous Flaps. Clin Plast Surg. 1990 Oct;17(4):713–26.
45. Hallock GG. Simplified nomenclature for compound flaps. Plast Reconstr Surg. 2000 Apr;105(4):1465–70; quiz 1471–2.
46. Hallock GG. The complete classification of flaps. Microsurgery. 2004 Jan 8;24(3):157–61.
47. Reckley LK, Peck JJ, Roofe SB. Flap Basics III. Facial Plast Surg Clin North Am. 2017 Aug;25(3):337–46.
48. D'Arpa S, Toia F, Pirrello R, Moschella F, Cordova A. Propeller Flaps: A Review of Indications, Technique, and Results. Biomed Res Int. 2014;2014:1–7.
49. Lucas JB. The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps. Facial Plast Surg Clin North Am. 2017 Aug;25(3):303–11.
50. Hom DB, Goding GS. Skin flap physiology. In: Local Flaps in Facial Reconstruction. Elsevier; 2007. p. 15–30.
51. Pearl RM. A Unifying Theory of the Delay Phenomenon– Recovery from the Hyperadrenergic State. Ann Plast Surg. 1981 Aug;7(2):102–12.
52. adrenergic_nerves_and_the_delay_phenomenon.10.
53. Hom DB, Goding GS. Skin flap physiology. In: Local Flaps in Facial Reconstruction. Elsevier; 2007. p. 15–30.
54. Afridi NS, Paletz J, Morris S. Free Flap Failures: What to Do Next? Canadian Journal of Plastic Surgery. 2000 Feb 1;8(1):30–2.
55. microsurgery_costs_and_outcome.13.
56. Furchgott RF, Vanhoutte PM. Endothelium-derived relaxing and contracting factors. FASEB J. 1989 Jul;3(9):2007–18.
57. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004 Jan 17;24(6):468–75.

58. McCord JM. Oxygen-derived radicals: a link between reperfusion injury and inflammation. Fed Proc. 1987 May 15;46(7):2402–6.
59. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1988 Dec 1;255(6):H1269–75.
60. Thomas EL, Grisham MB, Jefferson MM. Myeloperoxidase-dependent effect of amines on functions of isolated neutrophils. Journal of Clinical Investigation. 1983 Aug 1;72(2):441–54.
61. Grisham MB, Jefferson MM, Melton DF, Thomas EL. Chlorination of endogenous amines by isolated neutrophils. Ammonia-dependent bactericidal, cytotoxic, and cytolytic activities of the chloramines. Journal of Biological Chemistry. 1984 Aug;259(16):10404–13.
62. Roth E. The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1998 Jan;1(1):97–9.
63. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004 Jan 17;24(6):468–75.
64. Kuo YR, Wang FS, Jeng SF, Lutz BS, Huang HC, Yang KD. Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOS but protecting eNOS expression in the flap vessels after ischemia/reperfusion injury. Surgery. 2004 Apr;135(4):437–46.
65. Roth E. The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury. Curr Opin Clin Nutr Metab Care. 1998 Jan;1(1):97–9.
66. Frelin C, Vigne P, Lazdunski M. The role of the Na+/H+ exchange system in cardiac cells in relation to the control of the internal Na+ concentration. A molecular basis for the antagonistic effect of ouabain and amiloride on the heart. Journal of Biological Chemistry. 1984 Jul;259(14):8880–5.
67. Miyamae M, Camacho SA, Weiner MW, Figueredo VM. Attenuation of postischemic reperfusion injury is related to prevention of [Ca2+]m overload in rat hearts. American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology. 1996 Nov 1;271(5):H2145–53.
68. Allen DM, Chen LE, Seaber A V, Urbaniak JR. Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. Clin Orthop Relat Res. 1995 May;(314):122–33.
69. Dröge W. Free Radicals in the Physiological Control of Cell Function. Physiol Rev. 2002 Jan 1;82(1):47–95.
70. Navarro-Yepes J, Burns M, Anandhan A, Khalimonchuk O, del Razo LM, Quintanilla-Vega B, et al. Oxidative Stress, Redox Signaling, and Autophagy: Cell Death *Versus* Survival. Antioxid Redox Signal. 2014 Jul;21(1):66–85.
71. Roede JR, Stewart BJ, Petersen DR. Hepatotoxicity of Reactive Aldehydes. In: Comprehensive Toxicology. Elsevier; 2010. p. 581–94.
72. Piwowar A. [Advanced oxidation protein products. Part I. Mechanism of the formation, characteristics and property]. Pol Merkur Lekarski. 2010 Feb;28(164):166–9.
73. Petersen RC, Reddy MS, Liu PR. Advancements in Free-Radical Pathologies and an Important Treatment Solution with a Free-Radical Inhibitor. SF J Biotechnol Biomed Eng. 2018;1(1).
74. Andrew P. Enzymatic function of nitric oxide synthases. Cardiovasc Res. 1999 Aug 15;43(3):521–31.

75. Wheeler CR, Salzman JA, Elsayed NM, Omaye ST, Korte DW. Automated assays for superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase, and glutathione reductase activity. Anal Biochem. 1990 Feb;184(2):193–9.
76. O'Shaughnessy KD, Mustoe TA. The Surgical TRAM Flap Delay: Reliability of Zone III Using a Simplified Technique under Local Anesthesia. Plast Reconstr Surg. 2008 Dec;122(6):1627–30.
77. McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. The Design of a Pedicle Flap in the Rat to Study Necrosis and its Prevention. Plast Reconstr Surg. 1965 Feb;35(2):177–82.
78. Ha JH, Lee SY, Choi TH, Park SO. Surgical delay increases the survival of expanded random-pattern flap in pediatric patients. Sci Rep. 2023 Nov 6;13(1):19204.
79. Pang CY, Forrest CR, Neligan PC, Lindsay WK. Augmentation of Blood Flow in Delayed Random Skin Flaps in the Pig. Plast Reconstr Surg. 1986 Jul;78(1):68–74.
80. O'Shaughnessy KD, Mustoe TA. The Surgical TRAM Flap Delay: Reliability of Zone III Using a Simplified Technique under Local Anesthesia. Plast Reconstr Surg. 2008 Dec;122(6):1627–30.
81. Wan C, Maldonado C, Papanicolaou G, Anderson GL, Overgoor M, Kon M, et al. Reducing the Vascular Delay Period in Latissimus Dorsi Muscle Flaps for Use in Cardiomyoplasty. Plast Reconstr Surg. 2002 Apr;109(5):1630–6.
82. Scheufler O, Andresen R, Kirsch A, Banzer D, Vaubel E. Clinical Results of TRAM Flap Delay by Selective Embolization of the Deep Inferior Epigastric Arteries. Plast Reconstr Surg. 2000 Apr;105(4):1320–9.
83. Reinisch JF. The Pathophysiology of Skin Flap Circulation. Plast Reconstr Surg. 1974 Nov;54(5):585–98.
84. Pearl RM. A Unifying Theory of the Delay Phenomenon– Recovery from the Hyperadrenergic State. Ann Plast Surg. 1981 Aug;7(2):102–12.
85. Lantieri LA, Carayon A, Maistre O, Evrin J, Hemery F, Torossian JM, et al. Tissue and plasma levels of endothelin in free flaps. Plast Reconstr Surg. 2003 Jan;111(1):85–91.
86. Kreidstein ML, Pang CY, Levine RH, Knowlton RJ. The Isolated Perfused Human Skin Flap. Plast Reconstr Surg. 1991 Apr;87(4):741–9.
87. Pang CY, Forrest CR, Neligan PC, Lindsay WK. Augmentation of Blood Flow in Delayed Random Skin Flaps in the Pig. Plast Reconstr Surg. 1986 Jul;78(1):68–74.
88. Dorion D, Boyd JB, Pang CY. Augmentation of transmidline skin perfusion and viability in transverse rectus abdominis myocutaneous (TRAM) flaps in the pig. Plast Reconstr Surg. 1991 Oct;88(4):642–9.
89. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. Ann Surg. 2004 Jun;239(6):866–73; discussion 873-5.
90. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic Preconditioning Attenuates Postischemic Leukocyte - Endothelial Cell Interactions Role of Nitric Oxide and Protein Kinase C. Circulation Journal. 2006;70(8):1070–5.
91. Schoen M, Rotter R, Gierer P, Gradl G, Strauss U, Jonas L, et al. Ischemic Preconditioning Prevents Skeletal Muscle Tissue Injury, But Not Nerve Lesion Upon Tourniquet-Induced Ischemia. Journal of Trauma: Injury, Infection & Critical Care. 2007 Oct;63(4):788–97.

92. Tatlidede S, McCormack MC, Eberlin KR, Nguyen JT, Randolph MA, Austen WG. A Novel Murine Island Skin Flap for Ischemic Preconditioning. Journal of Surgical Research. 2009 Jun;154(1):112–7.
93. Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG. Ischemic Preconditioning of Skeletal Muscle Mitigates Remote Injury and Mortality. Journal of Surgical Research. 2008 Jul;148(1):24–30.
94. McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, Huang N, Moses MA, Neligan PC, et al. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: efficacy and mechanism. American Journal of Physiology-Regulatory, Integrative and Comparative Physiology. 2008 Aug;295(2):R681–9.
95. Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote Postconditioning may Attenuate Ischaemia–Reperfusion Injury in the Murine Hindlimb Through Adenosine Receptor Activation. European Journal of Vascular and Endovascular Surgery. 2010 Dec;40(6):804–9.
96. Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B, André M, Nibbelink M, Tamarat R, et al. Plasticity of Human Adipose Lineage Cells Toward Endothelial Cells. Circulation. 2004 Feb 10;109(5):656–63.
97. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose-Derived Cells. Cell Transplant. 2007 Oct 22;16(9):963–70.
98. Reichenberger MA, Heimer S, Schaefer A, Lass U, Gebhard MM, Germann G, et al. Adipose Derived Stem Cells Protect Skin Flaps Against Ischemia-Reperfusion Injury. Stem Cell Rev Rep. 2012 Sep 17;8(3):854–62.
99. Uysal AC, Mizuno H, Tobita M, Ogawa R, Hyakusoku H. The Effect of Adipose-Derived Stem Cells on Ischemia-Reperfusion Injury: Immunohistochemical and Ultrastructural Evaluation. Plast Reconstr Surg. 2009 Sep;124(3):804–15.
100. Meliga E, Strem BM, Duckers HJ, Serruys PW. Adipose-Derived Cells. Cell Transplant. 2007 Oct 22;16(9):963–70.
101. Hadzimustafic N, D'elia A, Duru C, Haykal S. Advances in Ischemia Reperfusion Injury Prevention in Free Flaps and Vascularized Composite Allotransplantation. Reperfusion Injuries - Advances in Understanding, Prevention, and Treatment [Internet]. 2023 Sep 19; Available from: http://dx.doi.org/10.5772/intechopen.112993
102. Ward R, Souder N, Stahl D, Hunter F, Probe R, Chaput C, et al. The Role of Nitric Oxide Synthase and Heme Oxygenase in the Protective Effect of Hypothermia in Ischemia-Reperfusion Injury. J Bone Joint Surg. 2009 Nov;91(11):2637–45.
103. Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Zhang X, Williams SJ, Baynosa RC, et al. Nitrite Attenuates Ischemia-Reperfusion–Induced Microcirculatory Alterations and Mitochondrial Dysfunction in the Microvasculature of Skeletal Muscle. Plast Reconstr Surg. 2011 Oct;128(4):279e–87e.
104. Dillon JP, Laing AJ, Chandler JRS, Wang JH, McGuinness A, Redmond HP. Pravastatin attenuates tourniquet-induced skeletal muscle ischemia reperfusion injury. Acta Orthop. 2006 Jan 8;77(1):27–32.
105. Cowled PA, Khanna A, Laws PE, Field JBF, Varelias A, Fitridge RA. Statins Inhibit Neutrophil Infiltration in Skeletal Muscle Reperfusion Injury. Journal of Surgical Research. 2007 Aug;141(2):267–76.

106. Zhang F, Oswald T, Lin S, Cai Z, Lei M, Jones M, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. Br J Plast Surg. 2003 Oct;56(7):653–9.
107. 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 Jun;57(4):317–25.
108. Seify H, Bulky U, Jones G. Effect of Vascular Endothelial Growth Factor-Induced Angiogenesis on TRAM Flap Harvesting after Abdominoplasty. Plast Reconstr Surg. 2003 Mar;111(3):1212–6.
109. Im MJ, Kim YS, Edwards RJ, Hoopes JE, Fenselau A. The Effect of Bovine Basic Fibroblast Growth Factor on Skin Flap Survival in Rats. Ann Plast Surg. 1992 Mar;28(3):242–5.
110. Carroll CMA, Carroll SM, Schuschke DA, Barker JH. Augmentation of Skeletal Muscle Flap Survival Using Platelet Derived Growth Factor. Plast Reconstr Surg. 1998 Aug;102(2):407–15.
111. Saha B. A Study of Antioxidant Foods' Potent Power Contributing to Human Longevity. J Nutr Food Sci. 2018;08(05).
112. Das DK, Maulik N. Antioxidant effectiveness in ischemia-reperfusion tissue injury. In 1994. p. 601–10.
113. Padayatty SJ, Katz A, Wang Y, Eck P, Kwon O, Lee JH, et al. Vitamin C as an Antioxidant: Evaluation of Its Role in Disease Prevention. J Am Coll Nutr. 2003 Feb 1;22(1):18–35.
114. Pehlivan FE. Vitamin C: An Antioxidant Agent. In: Vitamin C. InTech; 2017.
115. Aysun H. An overview of ascorbic acid biochemistry. Ankara Universitesi Eczacilik Fakultesi Dergisi. 2009;38(3):233–55.
116. Rouhier N, Lemaire SD, Jacquot JP. The role of glutathione in photosynthetic organisms: emerging functions for glutaredoxins and glutathionylation. Annu Rev Plant Biol. 2008;59:143–66.
117. Washko PW, Wang Y, Levine M. Ascorbic acid recycling in human neutrophils. J Biol Chem. 1993 Jul 25;268(21):15531–5.
118. Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C Reduces Ischemia- Reperfusion Injury in a Rat Epigastric Island Skin Flap Model. Ann Plast Surg. 1994 Dec;33(6):620–3.
119. Buettner GR. The Pecking Order of Free Radicals and Antioxidants: Lipid Peroxidation, α-Tocopherol, and Ascorbate. Arch Biochem Biophys. 1993 Feb;300(2):535–43.
120. Niki E, Traber MG. A History of Vitamin E. Ann Nutr Metab. 2012;61(3):207–12.
121. Rizvi S, Raza ST, Ahmed F, Ahmad A, Abbas S, Mahdi F. The role of vitamin e in human health and some diseases. Sultan Qaboos Univ Med J. 2014 May;14(2):e157-65.
122. Ebhohimen IE, Okanlawon S, Osagie AO, Izevbigie ON. Vitamin E in Human Health and Oxidative Stress Related Diseases [Internet]. Available from: www.intechopen.com
123. Lü J, Lin PH, Yao Q, Chen C. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. J Cell Mol Med. 2010 Apr 10;14(4):840–60.
124. Howard AC, McNeil AK, McNeil PL. Promotion of plasma membrane repair by vitamin E. Nat Commun. 2011 Dec 20;2(1):597.

125. Liu M, Wallmon A, Olsson-Mortlock C, Wallin R, Saldeen T. Mixed tocopherols inhibit platelet aggregation in humans: potential mechanisms. Am J Clin Nutr. 2003 Mar;77(3):700–6.
126. Codoñer-Franch P, Muñiz P, Gasco E, Domingo J V, Valls-Belles V. Effect of a Diet Supplemented with alpha-Tocopherol and beta-Carotene on ATP and Antioxidant Levels after Hepatic Ischemia-Reperfusion. J Clin Biochem Nutr. 2008 Jul;43(1):13–8.
127. Erkut B, Özyazıcıoğlu A, Karapolat BS, Koçoğulları CU, Keles S, Ateş A, et al. Effects of ascorbic Acid, alpha-tocopherol and allopurinol on ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle: an experimental study. Drug Target Insights. 2007;2:249–58.
128. Merhan O. Biochemistry and Antioxidant Effects of Melatonin [Internet]. Available from: www.intechopen.com
129. Hower IM, Harper SA, Buford TW. Circadian Rhythms, Exercise, and Cardiovascular Health. J Circadian Rhythms. 2018 Jul 12;16(1).
130. Moore RY. Neural control of the pineal gland. Behavioural Brain Research. 1995 Dec;73(1–2):125–30.
131. Ekmekcioglu C, Thalhammer T, Humpeler S, Mehrabi MR, Glogar HD, Hölzenbein T, et al. The melatonin receptor subtype MT $_2$ is present in the human cardiovascular system. J Pineal Res. 2003 Aug 16;35(1):40–4.
132. Amaral FG do, Cipolla-Neto J. A brief review about melatonin, a pineal hormone. Arch Endocrinol Metab. 2018 Aug;62(4):472–9.
133. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2009 Aug 6;44(4):175–200.
134. Dobsak P. Melatonin protects against ischemia-reperfusion injury and inhibits apoptosis in isolated working rat heart. Pathophysiology. 2003 May;9(3):179–87.
135. Tan D, Manchester LC, Terron MP, Flores LJ, Reiter RJ. One molecule, many derivatives: A never-ending interaction of melatonin with reactive oxygen and nitrogen species? J Pineal Res. 2007 Jan 29;42(1):28–42.
136. Aydogan S, Yerer MB, Goktas A. Melatonin and nitric oxide. J Endocrinol Invest. 2006 Mar 22;29(3):281–7.
137. Hardeland R. Melatonin, Its Metabolites and Their Interference with Reactive Nitrogen Compounds. Molecules. 2021 Jul 5;26(13):4105.
138. Zhao Y, Wang H, Chen W, Chen L, Liu D, Wang X, et al. Melatonin attenuates white matter damage after focal brain ischemia in rats by regulating the TLR4/NF-κB pathway. Brain Res Bull. 2019 Aug;150:168–78.
139. Imenshahidi M, Karimi G, Hosseinzadeh H. Effects of melatonin on cardiovascular risk factors and metabolic syndrome: a comprehensive review. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2020 Apr 30;393(4):521–36.
140. Reiter RJ, Paredes SD, Manchester LC, Tan DX. Reducing oxidative/nitrosative stress: a newly-discovered genre for melatonin. Crit Rev Biochem Mol Biol. 2009 Aug 6;44(4):175–200.
141. Aydemir S, Dogan D, Kocak A, Dilsiz N. The effect of melatonin on spinal cord after ischemia in rats. Spinal Cord. 2016 May 1;54(5):360–3.
142. Gurlek A, Celik M, Parlakpinar H, Aydogan H, Bay-Karabulut A. The protective effect of melatonin on ischemia–reperfusion injury in the groin (inferior epigastric) flap model in rats. J Pineal Res. 2006 May 21;40(4):312–7.

143. Fraga CG, Oteiza PI, Galleano M. In vitro measurements and interpretation of total antioxidant capacity. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects. 2014 Feb;1840(2):931–4.
144. Wayner DDM, Burton GW, Ingold KU, Locke S. Quantitative measurement of the total, peroxyl radical-trapping antioxidant capability of human blood plasma by controlled peroxidation. FEBS Lett. 1985 Jul 22;187(1):33–7.
145. Niki E. Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. Free Radic Biol Med. 2010 Aug 15;49(4):503–15.
146. Azzi A, Davies KJA, Kelly F. Free radical biology – terminology and critical thinking. FEBS Lett. 2004 Jan 30;558(1–3):3–6.
147. Sies H. Total Antioxidant Capacity: Appraisal of a Concept. J Nutr. 2007 Jun;137(6):1493–5.
148. Silvestrini A, Meucci E, Ricerca BM, Mancini A. Total Antioxidant Capacity: Biochemical Aspects and Clinical Significance. Int J Mol Sci. 2023 Jul 1;24(13):10978.
149. Cao G, Alessio HM, Cutler RG. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. Free Radic Biol Med. 1993 Mar;14(3):303–11.
150. Huang D, Ou B, Prior RL. The Chemistry behind Antioxidant Capacity Assays. J Agric Food Chem. 2005 Mar 1;53(6):1841–56.
151. Bartosz G. Non-enzymatic antioxidant capacity assays: Limitations of use in biomedicine. Free Radic Res. 2010 Jul 7;44(7):711–20.
152. Goldwyn RM, Lamb DL, White WL. An Experimental Study of Large Island Flaps in Dogs. Plast Reconstr Surg. 1963 Jun;31(6):528–36.
153. Petry JJ, Wortham KA. The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. Plast Reconstr Surg. 1984 Sep;74(3):410–3.
154. Gurunluoglu R, Siemionow MZ. The Microsurgical Groin Skin Flap in the Rat Model. In: Plastic and Reconstructive Surgery. London: Springer London; 2015. p. 53–62.
155. Gürünlüoğlu R, Bayramiçli M, Doğan T, Çakalağaoğlu F, Numanoğlu A. Use of Fascial Grafts as an Interface in Flap Prefabrication. Ann Plast Surg. 1999 Jul;43(1):42–8.
156. Padubidri AN, Browne E, Banbury J, Seimionow M. Arteriovenous Cross-Flow Flap in Rats: A Novel Skin Flap. Plast Reconstr Surg. 1997 Oct;100(5):1218–26.
157. Yenid??nya MO, Yenid??nya S. Initially Alloperfused Autograft: An Experimental Study with Rat Groin Free Flap. Plast Reconstr Surg. 2000 Feb;105(2):648–53.
158. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-Evans C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med. 1999 May;26(9–10):1231–7.
159. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem. 1951 Nov;193(1):265–75.
160. Ulusoy MG, Uysal A, Kocer U, Karaaslan O, Cuzdan SS, Ayyldz A, et al. Improved Flap Viability With Site-Specific Delivery of Sildenafil Citrate Using Fibrin Glue. Ann Plast Surg. 2005 Sep;55(3):292–6.
161. Rand-Luby L, Pommier RF, Williams ST, Woltering EA, Small KA, Fletcher WS. Improved Outcome of Surgical Flaps Treated with Topical Dimethylsulfoxide. Ann Surg. 1996 Oct;224(4):583–90.

162. Shiva N, Sharma N, Kulkarni YA, Mulay SR, Gaikwad AB. Renal ischemia/reperfusion injury: An insight on in vitro and in vivo models. Life Sci. 2020 Sep;256:117860.
163. Zhang X, Hu C, Ma ZG, Hu M, Yuan XP, Yuan YP, et al. Tisp40 prevents cardiac ischemia/reperfusion injury through the hexosamine biosynthetic pathway in male mice. Nat Commun. 2023 Jun 8;14(1):3383.
164. Güvenç M, Yüksel M, Kutlu T, Etyemez M, Gökçek İ, Cellat M. Protective effects of esculetin against ovary ischemia–reperfusion injury model in rats. J Biochem Mol Toxicol. 2024 Jan 4;38(1).
165. Ozbal S, Ergur BU, Erbil G, Tekmen I, Bagryank A, Cavdar Z. The effects of α-lipoic acid against testicular ischemia-reperfusion injury in rats. The Scientific World Journal. 2012;2012.
166. George J, Lu Y, Tsuchishima M, Tsutsumi M. Cellular and molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury: The role of oxidative stress and therapeutic approaches. Redox Biol. 2024 Sep;75:103258.
167. Kuroki T, Takekoshi S, Kitatani K, Kato C, Miyasaka M, Akamatsu T. Protective Effect of Ebselen on Ischemia-reperfusion Injury in Epigastric Skin Flaps in Rats. Acta Histochem Cytochem. 2022;55(5):149–57.
168. Akdemir O, Burak &, Tatar E, Gökhan A, Şirin C, Çavuşoğlu T, et al. Preventive effect of trimetazidine against ischemia-reperfusion injury in rat epigastric island flaps: an experimental study. Available from: https://doi.org/10.1007/s00238-020-01757-2
169. Seyid M, Tiftikcioglu Y, Erdem M, Akdemir O, Tatar BE, Uyanıkgil Y, et al. The Effect of Ceruloplasmin Against Ischemia-Reperfusion Injury in Epigastric Island Flap in Rats. Journal of Surgical Research. 2021 Nov 1;267:627–35.
170. Demiröz A, Derebasinlioglu H, Ercan A, Arslan H, Aydln Ö, Ekmekçi H, et al. Comparison of Ischemic Preconditioning and Systemic Piracetam for Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury in Musculocutaneous Flaps. In: Journal of Reconstructive Microsurgery. Thieme Medical Publishers, Inc.; 2021. p. 322–35.
171. de Lima Silva JJ, Guimarães SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PRL, Lima GG, Torres SM, et al. Effects of Copaifera langsdorffii Desf. on Ischemia-Reperfusion of Randomized Skin Flaps in Rats. Aesthetic Plast Surg. 2009 Jan 4;33(1):104–9.
172. Eroglu T, Bozkurt M, Kapi E, Selcuk CT, Kuvat SV, Tufek A, et al. A Study on the Effects of the Use of Propofol in Experimental Model Inferior Epigastric Island Flap on Ischemia-Reperfusion Injury. J Craniofac Surg. 2017 Nov 1;28(8):2193–8.
173. Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic Preconditioning Attenuates Postischemic Leukocyte - Endothelial Cell Interactions Role of Nitric Oxide and Protein Kinase C. Circulation Journal. 2006;70(8):1070–5.
174. Bilgin-Karabulut A, Ademoglu E, Aydin I, Erer M, Gökkus C, Mahallesi L, et al. Protective Effects of Vitamins A and E Pretreatment in Venous Ischemia/Reperfusion Injury. Vol. 17, Journal of Reconstructive Microsurgery. 2001.
175. Aydın A, Yıldırım AM. Effects of alpha lipoic acid on ischemia-reperfusion injury in rat hindlimb ischemia model. Ulus Travma Acil Cerrahi Derg. 2016 Nov 1;22(6):509–15.

176. Santoso RD, Hamid ARRH, Mahadewa TGB, Sanjaya IGPH, Budayanti NNS, Herawati S. Ascorbic acid and calcitriol reduce TNF-α to improve the viability of modified McFarlane random skin flaps in Wistar rats. Bali Medical Journal. 2023;12(3):2981–5.
177. Doğanay S, Budak Ö. Effects of Ascorbic Acid and Sodium Selenite on Inflammatory Response and Apoptosis in Renal Ischemia-Reperfusion Injury. Online Türk Sağlık Bilimleri Dergisi. 2022 Mar 1;7(1):130–6.
178. Medling BD, Bueno R, Chambers C, Neumeister MW. The effect of vitamin E succinate on ischemia reperfusion injury. Hand. 2010 Feb;5(1):60–4.
179. Koya D, Lee IK, Ishii H, Kanoh H, King GL. Prevention of glomerular dysfunction in diabetic rats by treatment with d-alpha-tocopherol. Journal of the American Society of Nephrology. 1997 Mar;8(3):426–35.
180. Kanter M. Protective effects of melatonin on testicular torsion/detorsion-induced ischemia–reperfusion injury in rats. Exp Mol Pathol. 2010 Dec;89(3):314–20.
181. Kireev R, Bitoun S, Cuesta S, Tejerina A, Ibarrola C, Moreno E, et al. Melatonin treatment protects liver of Zucker rats after ischemia/reperfusion by diminishing oxidative stress and apoptosis. Eur J Pharmacol. 2013 Feb;701(1–3):185–93.
182. Okatani Y, Wakatsuki A, Shinohara K, Taniguchi K, Fukaya T. Melatonin protects against oxidative mitochondrial damage induced in rat placenta by ischemia and reperfusion. J Pineal Res. 2001 Sep 21;31(2):173–8.
183. Karaoz E, Gultekin F, Akdogan M, Oncu M, Gokcimen A. Protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on lung toxicity induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Experimental and Toxicologic Pathology. 2002 Jan;54(2):97–108.
184. Gultekin F, Delibas N, Yasar S, Kilinc I. In vivo changes in antioxidant systems and protective role of melatonin and a combination of vitamin C and vitamin E on oxidative damage in erythrocytes induced by chlorpyrifos-ethyl in rats. Arch Toxicol. 2001 Apr 10;75(2):88–96.
185. Dreher, Gabard, Schwindt, Maibach. Topical melatonin in combination with vitamins E and C protects skin from ultraviolet-induced erythema: a human study *in vivo*. British Journal of Dermatology. 1998 Aug;139(2):332–9.
186. Christian Danielsen C, Wiggers H, Rud Andersen H. Increased Amounts of Collagenase and Gelatinase in Porcine Myocardium Following Ischemia and Reperfusion. J Mol Cell Cardiol. 1998 Jul;30(7):1431–42.
187. Topp SG, Zhang F, Chatterjee T, Lineaweaver WC. Role of Nitric Oxide in Surgical Flap Survival. J Am Coll Surg. 2005 Oct;201(4):628–39.
188. Esme H, Fidan H, Koken T, Solak O. Effect of lung ischemia–reperfusion on oxidative stress parameters of remote tissues. European Journal of Cardio-Thoracic Surgery. 2006 Mar;29(3):294–8.
189. Cockrell A, Laroux FS, Jourd'heuil D, Kawachi S, Gray L, Van der Heyde H, et al. Role of Inducible Nitric Oxide Synthase in Leukocyte Extravasationin Vivo. Biochem Biophys Res Commun. 1999 Apr;257(3):684–6.
190. Gimeno G, Carpentier PH, Desquand-Billiald S, Finet M, Hanf R. Respective role of lipoxygenase and nitric oxide-synthase pathways in plasma histamine-induced macromolecular leakage inconscious hamsters. Br J Pharmacol. 1999 Apr 29;126(8):1801–9.

191. Qi WN, Chen LE, Zhang L, Eu JP, Seaber A V., Urbaniak JR. Reperfusion injury in skeletal muscle is reduced in inducible nitric oxide synthase knockout mice. J Appl Physiol. 2004 Oct;97(4):1323–8.
192. Kane AJ, Barker JE, Mitchell GM, Theile DRB, Romero R, Messina A, et al. Inducible nitric oxide synthase (iNOS) activity promotes ischaemic skin flap survival. Br J Pharmacol. 2001 Apr 29;132(8):1631–8.
193. D'Amelio M, Sheng M, Cecconi F. Caspase-3 in the central nervous system: beyond apoptosis. Trends Neurosci. 2012 Nov;35(11):700–9.
194. Sumer BD, Gastman BR, Gao F, Haughey BH, Paniello RC, Nussenbaum B. Caspase Inhibition Enhances Ischemic Tolerance of Fasciocutaneous Flaps. Laryngoscope. 2005 Aug 3;115(8):1358–61.
195. Huang C, Qing L, Pang X, Fu J, Xiao Y, Tang J, et al. Melatonin Improved the Survival of Multi-Territory Perforator Flaps by Promoting Angiogenesis and Inhibiting Apoptosis via the NRF2/FUNDC1 Axis. Front Pharmacol. 2022 May 24;13.
196. Erdmann D, Sweis R, Wong MS, Niklason LE, du Laney T V., Levin SL, et al. Vascular Endothelial Growth Factor Expression in Pig Latissimus Dorsi Myocutaneous Flaps after Ischemia Reperfusion Injury. Plast Reconstr Surg. 2003 Feb;111(2):775–80.
197. Ali SS, Kasoju N, Luthra A, Singh A, Sharanabasava H, Sahu A, et al. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. Food Research International. 2008 Jan;41(1):1–15.
198. Curtin CO, King CG. The metabolism of ascorbic acid-1-C14 and oxalic acid-C14 in the rat. J Biol Chem. 1955 Oct;216(2):539–48.
199. Burns JJ, Mosbach EH, Schulenberg S. Ascorbic acid synthesis in normal and drug-treated rats, studied with L-ascorbic-1-C14 acid. J Biol Chem. 1954 Apr;207(2):679–87.
200. McKenna MC, Bieri JG. Tissue storage of vitamins A and E in rats drinking or infused with total parenteral nutrition solutions. Am J Clin Nutr. 1982 May;35(5):1010–7.
201. Yeleswaram K, McLaughlin LG, Knipe JO, Schabdach D. Pharmacokinetics and oral bioavailability of exogenous melatonin in preclinical animal models and clinical implications. J Pineal Res. 1997 Jan 30;22(1):45–51.