T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ AKTİVATÖR VE İNHİBİTÖRLERİNİN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ: SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. MERVE ÖZGER
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. CENK DEMİRDÖVER

İZMİR
EYLÜL 2023

T.C
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ AKTİVATÖR VE İNHİBİTÖRLERİNİN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ: SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA

Dr. MERVE ÖZGER
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. CENK DEMİRDÖVER

İZMİR
EYLÜL 2023

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum asistanlık eğitimim boyunca yetişmemde emeği olan, çalışmam sırasında bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen ilk başladığım günden bugüne kadar her aşamada yol gösteren, desteğini ve özverisini hep yanımda hissettiğim tez danışmanım olan değerli hocam Prof. Dr. Cenk DEMİRDÖVER'e, emeğini ve hoşgörüsünü esirgemeyen üst düzey bilgi ve deneyimlerini paylaşarak mesleki gelişimime büyük katkıları olan Prof. Dr. Mustafa YILMAZ'A, Prof. Dr. Adnan MENDERES'E ve Prof. Dr. Haluk VAYVADA'YA sonsuz teşekkür ederim.

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım ve pek çok şey paylaştığım tüm asistan arkadaşlarıma ve özellikle tezimin deney aşamasında çok büyük yardımları olan Dr. Safa Eren ATALMIŞ, Dr. Tahir BABAHAN'A

Histolojik incelemelerde çok büyük emekleri olan Gökçen BİLİCİ ve Prof. Dr. Güven ERBİL'e

Asistanlık eğitimim boyunca her zaman yanımda olan, desteğini ve şefkatini eksik etmeyen Tülay GÜLER'e

Beraber yıllarca beraber çalıştığım tüm servis ve ameliyathane hemşirelerimize, personellerimize ve sekreterlerimize,

Son olarak her türlü sorunumu çözen ve yardımını esirgemeyen kardeşim H. İbrahim ÖZGER'e ve aileme,

Sonsuz teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

TABLO DİZİNİ.....i
ŞEKİL DİZİNİ ii
GRAFİK DİZİNİ.....iv
SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ v
ÖZET.....vi
SUMMARY vii
1. GİRİŞ VE AMAÇ 1
2.GENEL BİLGİLER.....3
2.1.Deri.....3
2.1.1.Epidermis 3
2.1.1.1.Stratum bazale 3
2.1.1.2.Stratum spinosum 3
2.1.1.3.Stratum granulosum 4
2.1.1.4.Stratum korneum 4
2.1.2.Dermis 5
2.1.3.Deri Kanlanması 6
2.1.4.Deri Fizyolojisi 8
2.2.Flep Tanımı.....8
2.2.1.Flep Tarihçesi 9
2.2.2.Flep Sınıflandırılması 10
2.2.2.1.Deri Fleplerinin Kan Dolaşımına Göre Sınıflandırılması 11
2.2.2.1.1.Random Dolaşım Paternli Deri Flepleri 11
2.2.2.1.2.Aksiyel Dolaşım Paternli Deri Flepleri 11
2.2.3.Anjiyozom Konsepti.....12
2.2.4.Derinin Venöz Ağları 15
2.2.5.Flep Fizyolojisi 16
2.2.6.Flep Kaybı 17
2.2.6.1.İskemi-Reperfüzyon Hasarı 18
2.2.7.Flep Yaşayabilirliğini Artıran Faktörler.....19
2.2.7.1.Ameliyat Öncesi Değerlendirme ve Uygun Cerrahi Teknik 19

2.2.7.2.Medikal Tedaviler 20
2.2.7.2.1.Antikoagülanlar 20
2.2.7.2.2.Vazodilatatörler 21
2.2.7.2.3.Antienflamatuarlar.....21
2.2.7.2.4.Serbest Oksijen Radikali Oluşumunu Önlemeye Yönelik Tedaviler, Antioksidanlar 21
2.2.7.3.Cerrahi Delay (Flep Geciktirilmesi) ve İskemik Ön koşullandırma 22
2.2.7.4.Süperşarj ve Turboşarj 24
2.2.8.Flep Takibi 24
2.2.8.1.Klinik Gözlem 25
2.2.8.2.Sıcaklık Monitörizasyonu 25
2.2.8.3.Vital Boya Ölçümleri.....25
2.2.8.4.Doppler ile değerlendirme 26
2.2.8.5.Metabolik değerlendirme 26
2.3.Matriks Metalloproteinazlar.....26
2.3.1.Matriks Metalloproteinazların Yapısı ve Sınıflandırılması 28
2.3.2.Metalloproteinaz İnhibisyonu.....30
3. GEREÇ VE YÖNTEM.....33
3.1.Kullanılan Hayvanlar ve Hayvanların Bakım ve Barınma Koşulları 33
3.2.Cerrahi Planlama 34
3.2.1.Grup 1: Kontrol Grubu (n:8) 34
3.2.2.Grup 2: Oral Zn sülfat verilen grup (n:8).....35
3.2.3.Grup 3: Oral doksisiklin verilen grup (n:8).....35
3.2.4.Grup 4: Subkutan Marimastat verilen grup (n:8).....35
3.3.Anestezi 37
3.4.Çalışmada Kullanılan Medikal Ajanlar.....37
3.4.1.Doksisiklin 37
3.4.1.1.Farmokokinetik 38
3.4.1.2.Yan Etkileri 38
3.4.2.Marimastat 39
3.4.3.Çinko Sülfat.....40

3.4.3.1.Farmakodinamik: 41
3.5.Hayvan Modeli 42
3.5.1.Anatomi 42
3.5.2.Sıçan Dorsal Yarımada Flepleri 44
3.6.Cerrahi 45
3.7.Postoperatif Bakım 48
3.8.Enjeksiyonlar 48
3.9.Sakrifikasyon 48
3.10.İCG ile Kızılötesi Aracılı Anjiografi Çekimi 48
3.11.Yüzey Alan Ölçümü 51
3.12.Histopatolojik İnceleme İçin Örneklerin Alınması 53
3.13.Doku Takibi 53
3.14.Hematoksilen & Eozin Boyama 54
3.15.İmmünohistokimyasal Boyama 54
3.16.İstatistiksel Analiz 55
4. BULGULAR 56
4.1.Makroskopik Bulgular 57
4.1.1.Flep Nekroz Oranları 57
4.1.2.ICG ile Kızılötesi Aracılı Anjiografi 58
4.2.İmmunhistokimyasal Bulgular 60
5.TARTIŞMA 72
6.SONUÇLAR 79
7.KAYNAKLAR 81

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Sentetik MMP inhibitörlerinin sınıflandırılması.....32
Tablo 2: Çalışmada kullanılan anestezik ve indosiyanin yeşili.....36
Tablo 3: Tanımlayıcı İstatistikler Tablosu 57
Tablo 4: gruplara göre flep nekroz alan yüzdelerinin varyans analiz tablosu 57
Tablo 5: Spy sonuçları için varyans analizi tablosu.....59
Tablo 6: Tanımlayıcı İstatistikler Tablosu 70
Tablo 7: Histopatolojik değerlendirme ölçütleri ve puanlaması 70
Tablo 8: Histopatolojik değerlendirme tanımlayıcı istatistikler tablosu 71

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1: İnsan deri epidermis katmanları 4
Şekil 2: İnsan derisinin yapısı.....6
Şekil 3: Derinin arteriyel kan akımı ve pleksuslar 7
Şekil 4: Deri fleplerinin kan dolaşımına göre sınıflandırılması 11
Şekil 5: İnsan vücudu anjiyozomları 13
Şekil 6: Komşu Anjiyozomlar arasında anatomik sınırı tanımlayan kesik çizgi ile choke anastomoz (yukarıdaki) ve gerçek anastomoz (aşağıdaki) şematik görünümü 14
Şekil 7: Derinini venöz ağları.....15
Şekil 8: Yüzeyel (S) ve derin (D) venöz sistemin birleşmesinin şematik çizimi 16
Şekil 9: İskemik dokuda artan hipoksantin, reperfüzyon sonrasında ortama gelen oksijenle ksantin oksidaz varlığında reaksiyona girerek süperoksit (O_2^-) serbest radikalini oluşturur.....18
Şekil 10: Hücre hasarı sonucu oluşan araşidonik asit türevlerinin oluşumu 19
Şekil 11: Choke anastomozların iskemiye cevabı 24
Şekil 12: Matriks metalloproteinazların (MMP'ler) fonksiyonları 27
Şekil 13: Matriks metalloproteazların (MMP'ler) ve matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) arasındaki lokalizasyon ve etkileşimler 31
Şekil 14: Ratların barınma kafesi ve etiketlenmesi 34
Şekil 15: Deney gruplarının şematik gösterilmesi.....36
Şekil 16: Doksisiklin molekülü kimyasal formülü 37
Şekil 17: Doksisiklin (Monodoks, DEVA).....39
Şekil 18: Marimastat molekülü kimyasal formülü 39
Şekil 19: Marimastat molekülü 3D formülü.....40
Şekil 20: Marimastat (Marimastat, Adooq Bioscience) 40
Şekil 21: Çinko Sülfat (Zinco, BERKO) 42
Şekil 22: Sırt derisi dolaşım 43
Şekil 23: Sırt yarımada flepleri 45

Şekil 24: Kaudal tabanlı 3x9 cm ebatlarında McFarlane flebinin planlanması 46
Şekil 25: Kaudal bazlı McFarlane flebinin cilt insizyonlarının tamamlanması 46
Şekil 26: Flebin kaldırılışı ve flebin alt yüzünün makroskobik görünümü 47
Şekil 27: Flebin kaldırıldığı zemine sütürler ile sütüre edilmesi.....47
Şekil 28: Kliniğimizde yer alan SPY Elite System Görüntüleme Cihazı.....49
Şekil 29: SPY Elite System ve SPY-Q Analysis Toolkit ile yapılan analiz 50
Şekil 30: Fotoğrafın Adobe Photoshop programına yüklenmesi ve çokgen kement aracı seçilmesi 51
Şekil 31: Alan seçimi yapıldıktan sonra histogram seçilerek seçilen alanın piksel değerinin görüntülenmesi 52
Şekil 32: Tüm flep alanın histogram aracı ile piksel değerinin hesaplanması 52
Şekil 33: Flep nekroz alanının histogram aracı ile piksel değerinin hesaplanması ...53
Şekil 34: Postoperatif 7. Günde flep nekroz alanı ve insizyonların görünümü.....56
Şekil 35: Postoperatif 7. Günde flebin alttan makroskobik damarlanma artışının gözlenmesi 57
Şekil 36: Kontrol grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü 61
Şekil 37: Çinko Sülfat grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü 61
Şekil 38: Doksisiklin grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü 62
Şekil 39: Marimastat grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü 62
Şekil 40: Kontrol grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik görünümü 63
Şekil 41: Çinko sülfat grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik 63
Şekil 42: Doksisiklin grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik görünümü.....64
Şekil 43: Marimastat grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik 64
Şekil 44: Kontrol grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama 65
Şekil 45: Çinko sülfat grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama.....65
Şekil 46: Doksisiklin grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama 66
Şekil 47: Marimastat grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama 66
Şekil 48: Kontrol grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama.....68
Şekil 49: Çinko sülfat grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama.....69
Şekil 50: Doksisiklin grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama.....69
Şekil 51: Marimastat grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama 70

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Tüm grupların hesaplanan nekroz alan yüzdesi dağılımları.....58
Grafik 2: Tüm grupların hesaplanan kanlanma yüzdesi dağılımları.....60
Grafik 3: Gruplar arasında flep damar sayımı sonuçları 67
Grafik 4: Gruplar arasında aktive Caspase-3 pozitif hücre sayısı 68
Grafik 5: Gruplar arasındaki histopatolojik değerlendirmesi 71

SİMGE VE KISALTMALAR DİZİNİ

APSAC	: Asetil Plazminojen -Streptokinaz Aktivatör Kompleks
ASA	: Asetil Salisilik Asit
ATP	: Adenozin Trifosfat
BM	: Bazal Membran
Ca^{+2}	: Kalsiyum
CO_2	: Karbondioksit
Dk	: Dakika
DMAH	: Düşük Molekül Ağırlıklı Heparinin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DNA	: Deoksiribonükleik Asit
ESM	: Ekstrasellüler Matriks
HIF-1α	: Hipoksi ile İndüklenebilir Faktör 1α
ICG	: İndosiyanin Yeşili
KC	: Keratinosit
Kg	: Kilogram
L	: Litre
M.Ö	: Milattan Önce
Mg	: Miligram
Ml	: Mililitre
Mm	: Milimetre
MMP	: Matriks Metalloproteinazlar
MT1-MMP	: Membran Tip-1 Matriks Metalloproteinaz
NC1	: Kolajen Olmayan Alan
O_2^-	: Süperoksit
PARP	: Poli (ADP-Riboz) Polimerazı
RNA	: Ribonükleik Asit
RPU	: Relatif Perfüzyon Ünite
Sa	: Saat
SOD	: Süperoksit Dismutazın
TACE	: Tümör Nekroz Faktör-Alfa Dönüştürücü Enzimi
TIMP	: Matriks Metalloproteinazın Doku İnhibitörü
TNF- α	: Tümör Nekroz Faktörü A
t-PA	: Doku Plazminojen Aktivatörü
TRAIL	: Tümör Nekroz Faktörü ile İlişkili Apoptoz İndükleyici Ligand
TRAM	: Transvers Rektus Abdominis Flebi
TXA_2	: Trombaksan A_2
VEGF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
Zn^{+2}	: Çinko

ÖZET

MATRİKS METALLOPROTEİNAZ AKTİVATÖR VE İNHİBİTÖRLERİNİN FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİNE ETKİSİ: SIÇANLARDA DENEYSEL ÇALIŞMA

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahide travma sonucu oluşan doku defektlerinde, tümör rezeksiyonu sonucu gereken rekonstrüksiyonlarda, konjenital malformasyonların düzeltilmesinde flepler sıklıkla kullanılmaktadır. Flep boyunda uzama, hatalı planlama veya travma varlığında flep distalinde iskemik nekroz gözlenebilir. Flepte meydana gelen bu iskemiyi önlemek için cerrahi geciktirme işlemi uygulanarak flep damar yoğunluğun artırılması ya da sempatolitik ajan, vazodilatatör, antitrombotik, antikoagülan, antioksidan ilaçlar gibi medikal tedaviler uygulanmıştır. Matriks metalloproteinazların yara iyileşmesi ve anjiogenezde rol oynadıkları gösterilmiştir. Çalışmada amacımız literatürde daha önce kullanılmayan MMP aktivatör ve inhibitörlerini kullanılarak flep yaşayabilirliği üzerinde olan etkisini incelemek ve flep yaşayabilirliğini artırmaktır. Bu amaçla enzim aktivatörü olarak çinko sülfat, inhibitör olarak doksisiklin ve marimastat kullanılmıştır.

Çalışmada 32 adet 12 haftalık wistar albino erkek rat sırtlarından McFarlane flebi eleve edildi. Ratlar 8'li gruplara ayrılarak; kontrol grubu, doksisiklin, çinko sülfat ve marimastat verilen 4 farklı deney grubuna ayrıldı. İlaçlar ilk dozu operasyondan 1 sa önce olmak üzere günde bir kez 7 gün boyunca uygulandı. 7. günde iv indosiyanin yeşili floresans görüntüleme ile flep kanlanması ölçüldü. Flep nekroz alanları ölçümü Adobe Photoshop CC 2017 programı ile yapıldı. Deney sonlandırılıp flepten alınan örneklere histopatolojik inceleme yapıldı.

Çalışmada marimastat verilen grupta flep nekroz oranın anlamlı ($p=0.002$) olarak en az ve flep kanlanma oranının anlamlı ($p=0.005$) olarak en fazla olduğu görüldü. Histopatolojik incelemede anjiogenezde üç deney grubunda anlamlı ($p=0,0109$) artış olduğu, apoptoziste ve enflamasyonda anlamlı ($p=0,0036$/ $p=0,048$) azalma olduğu görüldü.

Flep yaşayabilirliği ile ilgili birçok yöntem denenmiş ve flep yaşayabilirliği artırılmaya çalışılmıştır. Sonuçlar değerlendirildiğinde daha önce çalışılmamış olan hücre fonksiyonlarının birçoğunda etkili olan matriks metalloproteinazlarının flep yaşayabilirliğinde etkili olduğunu ve bir inhibitor olan marimastatın flep yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkisi olduğu görülmüştür.

Anahtar kelime: apoptoz, flep yaşayabilirliği, hipertrofik skar, marimastat, matriks metalloproteinaz

SUMMARY

EFFECT OF MATRIX METALLOPROTEINASE ACTIVATORS AND INHIBITORS ON FLAP VIABILITY: AN EXPERIMENTAL STUDY IN RATS

In plastic, reconstructive and aesthetic surgery, flaps are commonly used in tissue defects caused by trauma, in reconstructions required after tumor resection, and for correcting congenital malformations. Ischemic necrosis may occur in the distal part of the flap if the flap is stretched, incorrectly planned, or exposed to trauma. Techniques such as surgical delay to increase the vascular density of the flap or medical approaches such as treatments with sympatholytic agents, vasodilators, antithrombotic, anticoagulant, and antioxidant drugs have been used to prevent this ischemia in the flap. Matrix metalloproteinases have been shown to play a role in wound healing and angiogenesis. In our study, we aimed to examine the effects of matrix metalloproteinase activators and inhibitors, both of which have not been previously reported in the literature, on flap viability, and to increase flap viability. To that end, we used zinc sulfate as enzyme activator, and doxycycline and marimastat as inhibitors.

McFarlane flaps were elevated from the backs of 32 twelve-week-old male Wistar albino rats. The rats were divided into groups of 8 and assigned to 4 different groups: the Control Group, the Doxycycline Group, the Zinc Sulfate Group, and the Marimastat Group. The drugs were administered once a day for 7 days with the first dose one hour before the operation. On the 7th day, blood flow to the flap was measured by imaging after indocyanine green was administered intravenously. Flap necrosis areas were measured using the Adobe Photoshop CC 2017 program. The experiment was then terminated and samples taken from the flaps were histopathologically examined.

Flap necrosis rate was significantly ($p=0.002$) lowest and flap blood supply rate was significantly ($p=0.005$) highest in the Marimastat Group. Histopathologic examination revealed significant ($p=0.0109$) increase in angiogenesis and significant ($p=0.0036/p=0.048$) decrease in apoptosis and inflammation in the three study groups.

Many methods have been tried to study and increase flap viability. The results of our study showed that matrix metalloproteinases, which are effective in many cell functions that have not been studied before, were effective in flap viability and that the inhibitor marimastat had a favorable effect on flap viability.

Keywords: apoptosis, flap viability, hypertrophic scar, marimastat, matrix metalloproteinase

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin ana ilkelerinin başında insan vücudunun bütünlüğünün korunarak, form ve fonksiyonun sağlanması gelmektedir. Bu bağlamda flepler; yanıklarda, travmatik yaralarda, tümör cerrahisinde ve konjenital deformiteleri gidermede plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahide sıkça tercih edilen girişimlerdendir. Kan dolaşımı bozulmadan vücudun başka alanlarına aktarılan dokulara flep ismi verilir.

Flep cerrahisindeki gelişmelere rağmen, flep nekrozu halen büyük bir sorun olarak karşımıza çıkmaya devam etmektedir. Flep nekrozu arteriyel yetmezlik, venöz yetmezlik veya her ikisinin birleşiminin bir kombinasyonu sonucu meydana gelebilmektedir.

Random deri flepleri, olağanüstü esnekliklerinden dolayı yara onarımı ve kozmetik iyileştirme için yaygın olarak kullanılır. Random fleplere kan, kan damarları tarafından sağlanmadığı için, bu flepler için en uygun en-boy oranı 1,5-2:1 ile sınırlıdır.[1] Bu sınırın aşılması durumunda fleplerin distalinde %10-15'inde iskemik nekroz görülebilir.[2] Kan akımı, metabolik faktörler ve dokuların iskemi ve hipoksiye toleransı flep yaşayabilirliğini etkileyen üç ana faktördür.[1] İskemik hipoksi ve inflamasyon flep nekrozuna sebep olur. Random deri fleplerinin distalinde meydana gelen nekrozu, flepte anjiyogenezisi artırarak, kan akımını artırarak[3], inflamasyonu inhibe ederek ve iskemi-reperfüzyon hasarını azaltarak önlenebilir.[4]

Geciktirme prosedürleri uygulanarak flep distalinde nekroz görülmeden flep boyu artırılabilir. Ancak cerrahi geciktirme işlemi için hastanın operasyon sayısı artmakta bu da tedavi süresini uzatarak hastane yatış süresini ve maliyeti artırmaktadır. Bu sebeple flep yaşayabilirliğini arttıran çeşitli farmakolojik ajanlar kullanılarak oluşabilecek nekroz önlenmeye çalışılmıştır. Flep kanlanmasını artırmak için oda ısısının artırılması, vazodilatatör ilaçlar, antikoagülan ve antitrombotik ilaçlar, kalsiyum kanal blokerleri kullanılmakta iken flep iskeminin etkisini azaltmak için ise antienflamatuar ilaçlar, antioksidanlar, hiperbarik oksijen tedavisi gibi yöntemler kullanılmaktadır.

Ekstrasellüler matriksin en önemli işlevi, dokuları spesifik mekanik ve biyokimyasal özellikleri ile korumaktır. Hücre matriks etkileşimleri, matriks

moleküllerinde ve bağlayıcı hücrenin yüzeyinde bulunan spesifik hücre reseptörlerinin ve epitoplarının varlığının sonucudur. Reseptörler ve epitoplar sadece hücre bağlantısı ve göçünde değil, aynı zamanda hücrelerin farklılaşmasının ve gen düzeyinde spesifik proteinlerin ekspresyonunun düzenlenmesinde ve uyarılmasında da baskın bir rol oynamaktadır. Ekstrasellüler matriks, hücrenin zararlı, fiziksel faktörlere karşı korunması için özel bir fizyolojik mikro ortam yaratır ve sinyallerin iletimini kolaylaştırır.

Ekstrasellüler matriks bileşenlerinden biri olan kolajenin parçalanması, gelişim, morfogenez, doku yeniden şekillenmesi ve onarımında çok önemli bir süreçtir. Fizyolojik şartlarda yapım ve yıkımı sıkı bir şekilde düzenlenir ve düzensizliği kanser, romatoid artrit, nefrit, kronik ülserler ve kistik fibrozis gibi hastalıkların nedenleri arasındadır. ESM yıkımından majör olarak matriks metalloproteinazları sorumludur. Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler), hücre proliferasyonu, göçü (adhezyon/dağılım), farklılaşması, anjiyogenez, apoptoz ve konak savunması gibi hücre davranışlarında önemli bir rol oynayan çinkoya bağımlı endopeptidazların bir ailesidir. Yara iyileşmesinde ve hücre göçünde esastırlar.[4] MMP'lerin, hücre zarına bağlı büyüme faktörlerinin öncülerinin salınması, büyüme faktörlerinin biyoyararlanımını modüle etmesi ve hücre proliferasyon sinyallerini düzenlemesi gibi mekanizmalarla tümör hücrelerinin büyümesini kontrol ettiği gösterilmiştir.[5]

MMP'lerin, hücre zarına bağlı büyüme faktörlerinin öncülerinin salınması, büyüme faktörlerinin biyoyararlanımını modüle etmesi ve hücre proliferasyon sinyallerini düzenlemesi gibi mekanizmalarla tümör hücrelerinin büyümesini kontrol ettiği gösterilmiştir. Literatürde MMP'ler ve kanser üzerine birçok çalışma olmasına rağmen flep yaşayabilirliği üzerine bir çalışmayla karşılaşmadık. Bu çalışmada ise McFarlane flebinde MMP aktivatör ve inhibitörlerinin flep yaşayabilirliği üzerine olan etkisini gösterip bu etkinliklerini karşılaştırmayı amaçladık.

2.GENEL BİLGİLER

2.1.Deri

Deri insan vücut ağırlığının yaklaşık %16'sını oluşturarak insan vücudunun en geniş organıdır.[6] Deri, deri grefti, flep cerrahisi ve yanık ile uğraşan cerrahlar için günlük rutinde daha fazla önem taşır. Derinin dış fiziksel, kimyasal ve biyolojik etkenlere karşı koruma, sıvı kaybını önleme ve termoregülasyon gibi görevleri vardır. Deri; epidermis, dermis ve subkutan dokudan oluşur. Epidermis temel olarak keratinositlerden oluşur ve daha çok koruyucu görevi vardır. Dermis temel olarak kolajen fibrillerinden oluşur. Dermis altında subkutan doku bulunur. Subkutan doku liposit adı verilen yağ hücrelerinden oluşur. Bu tabakaların kalınlığı yerleşim yerlerine göre farklılıklar gösterir. Epidermis göz kapağında 0,1 mm'den daha ince iken palmar bölge ve ayak tabanında yaklaşık 1,5mm'dir. Dermis ise sırt bölgesinde üzerindeki epidermisin yaklaşık 40 katı kalınlığındadır.[7]

2.1.1.Epidermis

Epidermis majör hücre tipi keratinosit olan stratifiye skuamöz epitelden oluşur. Keratinositler, keratin ve yaralanma anında sitokin sentezlerler. Epidermis stratum bazale, stratum spinosum, stratum granulosum ve stratum korneum adı verilen 4 tabakadan oluşur.

2.1.1.1.Stratum bazale

Genellikle tek hücre kalınlığında olur. Melanositler bu tabakada yer alarak deriye rengini verirler. Melanositler hücre popülasyonunun %5-10 unu oluşturur.

2.1.1.2.Stratum spinosum

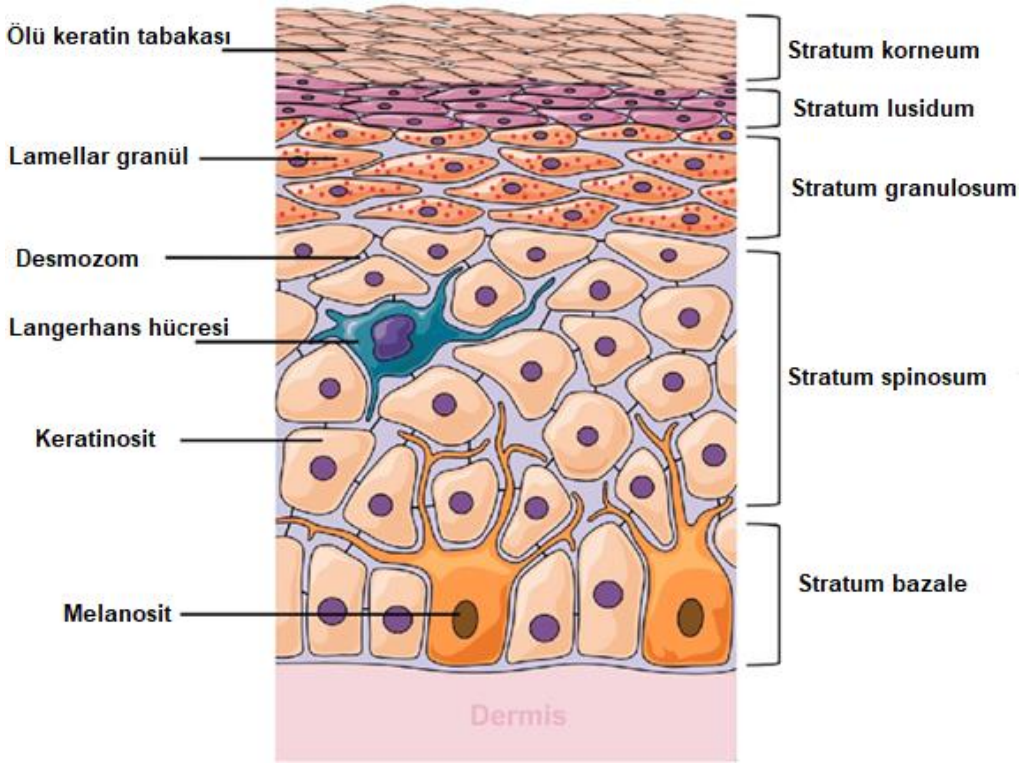
Bazal hücreler yüzeyel tabakaya doğru ilerlerken polihedral şekil alarak mikroskop altında dikensi yapılı hücreler olarak gözlenir. Hücreler arasında desmozom denilen bağlantılar bulunur. Bu tabakada hücreler arasında immun yanıtta rol alan Langerhans hücreleri saptanabilir.

2.1.1.3.Stratum granulosum

Bu tabakada keratinositlerin içinde keratohiyalin denilen granüller bulunur. Ayrıca hücre sitoplazmasında Odland cisimcikleri denilen küçük lamellar granüller içerir. Granüler hücreler içeriğindeki lipid içeriğini intersellüler aralığa bırakarak derinin bariyer fonksiyonunda ve stratum korneum tabakasının intersellüler kohezyonunda rol oynar.

2.1.1.4.Stratum korneum

Stratum granulosum tabakasından göç eden keratinositlerin oluşturduğu epidermisin en dış tabakasıdır. Hücreler nükleus ve sitoplazmik organellerini kaybederek korneosit ismini alırlar. Hücreler arasında çapraz bağlı disülfid bağlı keratin filamentleri gözlenir. Bu tabaka palmar ve plantar bölgede daha kalındır. Palmoplantar bölgede ek olarak stratum lucidum tabakası bulunur. Bu tabakada hücrelerin hala nükleusları vardır. Bazal tabakadan en yüzeyel tabakaya hücrelerin diferansiye olması yaklaşık 28 gün sürer. Bu diferansiyasyon süreci hastalık dönemlerinde uzayabilir.



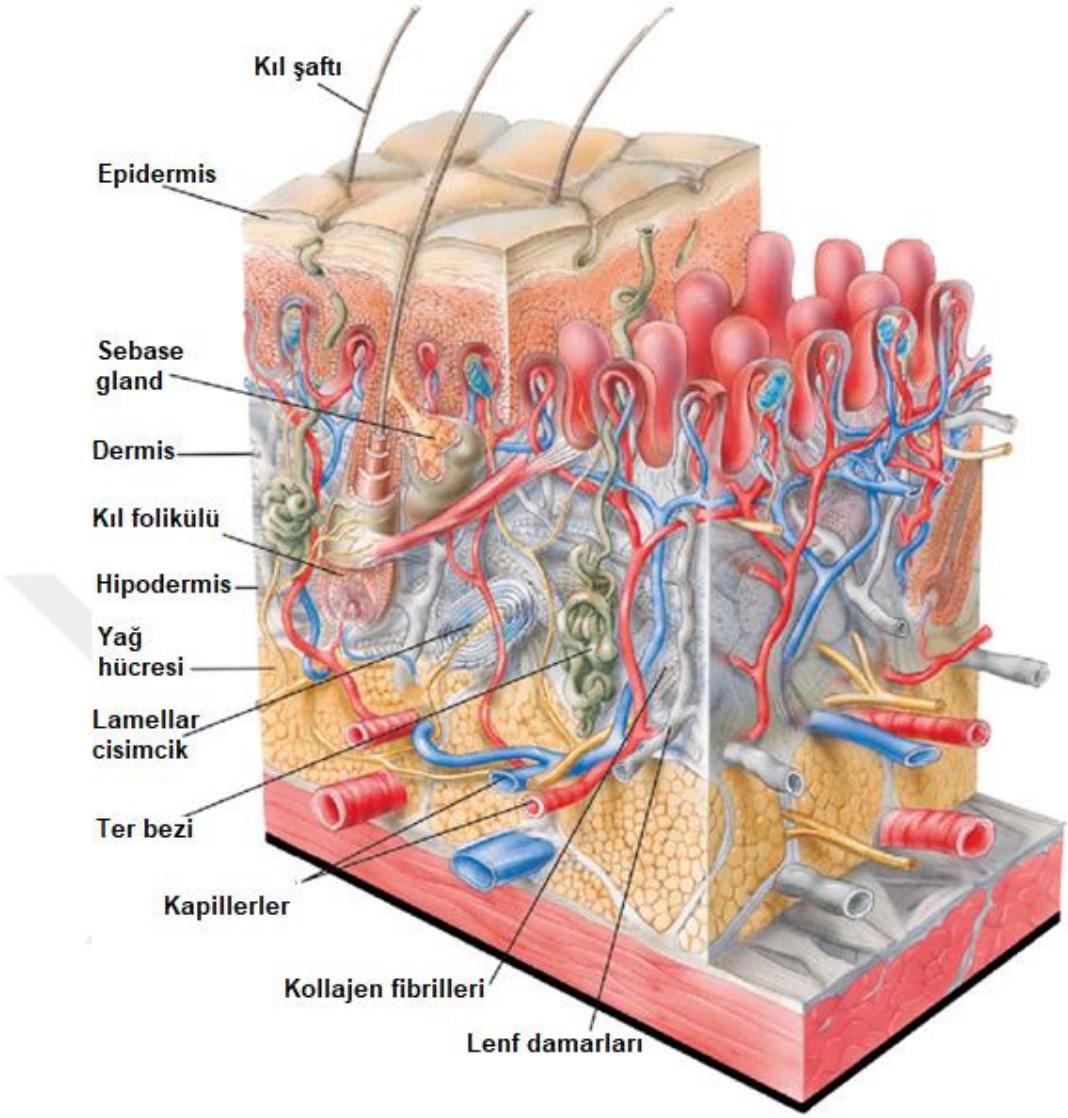
Şekil 1: İnsan deri epidermis katmanları[8]

2.1.2.Dermis

Dermis, epidermis ve subkutan bağ dokuya bağlayan vücudu mekanik yaralanmalara karşı koruyan ve özel yapılar içeren bir tabakadadır. Kalınlığı bulunduğu bölgeye göre değişkenlik göstermekle birlikte en kalın sırttadır. Papiller ve retiküler dermis denilen 2 tabakadan oluşur. Papiller dermis, dermisin ince yüzeyel epidermisle çok sayıda girintiye sahip dermal papillaları içeren tabakasıdır. Bunun hemen altında retiküler dermis bulunur. Papiller dermis tabakasının bu parmaksı çıkıntılarının içerisinde yoğun bir kılcal damar ağı bulunmaktadır. Bu sayede epidermis tabakası difüzyonla beslenir. Papiller dermis tabakasında ayrıca mast hücresi, histiyositler fibroblastlar bulunur. Hissetmemizi sağlayan serbest sinir uçları ve dokunma ve basıncı algılayan yapılar da bu tabakada yerleşmiştir.

Retiküler tabakada ise elastin ve kolajen lifleri yer alır. Bu tabaka zengin vasküler yapı ve aynı zamanda zengin duyu ve sempatik sinir ağına sahiptir. Elastin lifleri deriye esneklik sağlar. Kolajen lifleri ise papiller tabaka ve subkutan dokuya uzanarak gerilme kuvveti ve yapı tabakası olarak görev yapar. Kolajen, dermisin kuru ağırlığının %75'ini ve hacminin %30'unu oluşturur. Dermisin %75'i Tip 1 kolajen iken %15'i Tip 3 kolajenden oluşur. Kolajen kalite ve kantitesi yaşla değişir.[6]

Papiller dermiş ve epidermis arasında belirgin bir ayrım varken subkutan doku ve derin dermiş arasındaki ayrım net olarak seçilemez.



Şekil 2: İnsan derisinin yapısı İllüstrasyon: www.julius-ecke.de; Kaynak: www.skin-care-forum.basf.com

2.1.3.Deri Kanlanması

Deri vasküler kaynağı farklı tabakalarda bulunan birbiriyle ilişkili çok sayıda geniş ve zengin pleksuslardan oluşur. Deriye kan akışı muskulokutan, septokutan ve direkt arterlerden olur. Muskulokutan perforatörler kas dokusu içerisinden geçerek subkutan ve dermal pleksuslara ulaşan perforatörlerdir. Septokutan arterler ise kasları birbirinden ayıran fasiyal septalar boyunca ilerler ve yüzeysel kas fasyasının üstünde veya derininde deriye paralel seyreder. Direk kutanöz arterler ise deri altı düzlemde deriye paralel seyreden deriyi besleyen arterlerdir. Vücutta spesifik alanların

beslenmesini sağlar ve artere eşlik eden vena comitantes denilen venler eşlik eder.[9] Direk kutanöz ve septokutanöz arterler derinin daha geniş bölgelerini beslemekle sorumlu iken muskulokutan arterler daha sınırlı alanları besler.[10]

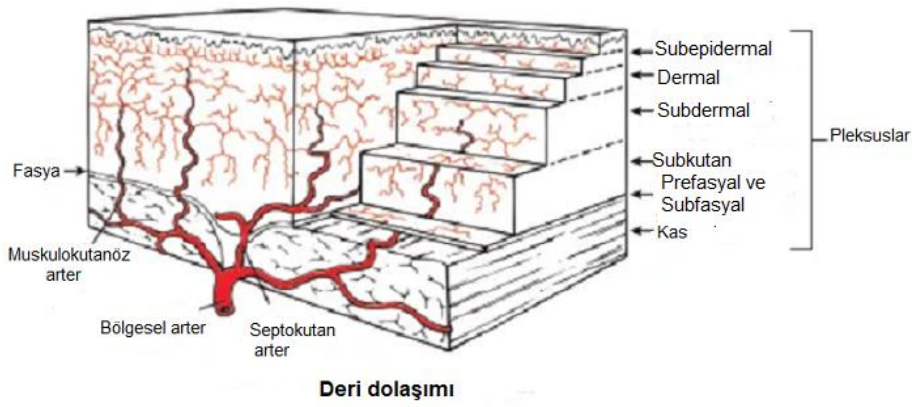
Deri ve yüzeyel yumuşak dokuyu besleyen dermal, subdermal, subkutan, prefasyal ve subfasyal adı verilen 5 ana pleksus tanımlanmıştır.[9] Dermal ve subdermal pleksus çoğu zaman tek ünite halinde dermal-subdermal pleksus olarak adlandırılmaktadır. Tüm pleksuslar birbiri ile kollateral kan akışını oluşturarak derinin zengin bir beslenme ağını oluşturur. Bu sağlam vasküler ağ derinin karmaşık dolaşım fizyolojisinin temelini oluşturur.

Fasyal pleksusta; arterler fasya içerisinde, fasya altında (subfasyal) ve üzerinde (prefasyal) seyrederler. Bu pleksuslardan prefasyal daha dominanttır. Bu ağ özellikle ekstremitelerde göze çarpar.

Subkutan pleksus; subkutan yağ dokuyu yüzeyel (yoğun) ve derin (gevşek) olarak iki ayrı tabakaya ayırır. Bu pleksus ise gövdede iyi gelişmiştir.

Subdermal pleksus; subkutan yağ doku e retiküler dermis birleşim yerinde bulunur. Buradan çıkan arterioller dermal pleksusu besler.

Dermal-Subepidermal pleksus; papiller dermişten başlayıp dermoepidermal bileşkeye uzanır. Deri kan dolaşımından sorumludur. Dermal pleksusun asıl görevi ısı regülasyonunu sağlamaktır.



Şekil 3: Derinin arteriyel kan akımı ve pleksuslar[11]

2.1.4.Deri Fizyolojisi

Derinin termoregülasyon ve homeostazisteki rolünden dolayı, deri kan akış hızı ve miktarında dikkate değer bir hemodinamik yeteneği vardır. Normal şartlar altında dahi deriye sağlanan kan miktarı beslenme için ihtiyacı olan kan miktarından yaklaşık 10 kat daha fazladır.[12] Vücut sıcaklığı arttıkça vazodilatasyona bağlı olarak kutanöz pleksuslardan akış 6L/dk ila 8L/dk ya kadar yükselebilir. Benzer şekilde, hipotermi ve cildin aşırı soğutulması da deri hücresel beslenmesini riske atacak seviyeye indirebilen vazokonstriksiyona sebep olabilir. Derinin sahip olduğu otonomik vazomotor mekanizmalar sistemik kan basıncının refleks kontrolünde önemli rol oynar. [13]

Derinin sahip olduğu bu kan akışı değişikliği sistemik kan basıncının düzenlenmesinde rol alan arteriollerin sahip olduğu düzenleyici sfinkterler sayesindedir. Dermal kapiller ağ, deri dolaşımından sorumlu 2 ana bölüme ayrılır. Retiküler dermiste bulunan kapiller ağ derinin beslenmesi için gerekli kan akışını sağlar. Arterioller sahip olduğu prekapiller sfinkterler sayesinde endotelyal ağ boyunca hipoksemi ve artan metabolik talebe yanıt olarak prekapiller sfinkterler genişleyerek deri lokal kan akışını artırır. Papiller dermiste bulunan kapiller ağ ise derinin termoregülatuar ve hemodinamik fonksiyonlarına izin veren arteriovenöz şantları içerir. Preşant arteriollerdeki sfinkterler, derinin lokal veya vücudu global olarak etkileyen termal etkiler veya sistemik kan basınç değişikliklerine yanıt olarak papiller dermiste bulunan kılcal ağ boyunca kan akışını düzenlemek için lokal otonomik asetilkolin ve norepinefrin salınımına yanıt verir. [14]

Damar içi basınç artışı vazokonstriksiyona neden olurken, basınçta azalma ise vazodilatasyona neden olarak devamlı kan akımını korumaya yardımcı olur. [15]

Hiperkapni, hiperkalemi, hipoksi ve asidoz vazodilatasyona neden olarak kan akımında artış yapar.

Kan viskozitesindeki hafif düşüş kan akışında artışa sebep olarak flep distaline giden kan akımını artırdığı ve beslenmenin daha iyi olduğu gösterilmiştir. [16]Ancak aneminin derinleşmesi ise tam tersine doku oksijenasyonunu bozacağından bu etkiyi tersine çevirir.[17] Polisitemia vera ve orak hücreli anemi gibi hastalıklarda flep yaşayabilirliği olumsuz etkilenir.[18]

2.2.Flep Tanımı

Doku defektlerinin rekonstrüksiyonu amaçlı vücudun çeşitli bölgelerinden hazırlanabilen cilt, cilt altı, fasya, kas ve kemik dokularını tek başına ya da kompozit olarak içerebilen kendine ait besleyici arter ve veni bulunan doku parçası flep olarak

adlandırılır. Flebi besleyen damarlara pedikül adı verilir ve bu aktarım esnasında korunur.

2.2.1.Flep Tarihçesi

İlk olarak M.Ö. 600'lü yıllarda nazal rekonstrüksiyon amaçlı Sushruta Samhita pediküllü alın flebini kullanmıştır. Sonrasında Gaspare Tagliocozzi 1597'de nazal rekonstrüksiyon için kullandığı 2 aşamalı kol flebini yayınlamıştır. 1887'de anatomist Karl Manchot 'un derinin kanlanmasını sağlayan damarların anatomik dağılımlarını yayınlaması sonucu derinin beslenmesi ve fizyolojisi daha iyi anlaşılmıştır. 1937'de Salmon Manchot'un çalışmasını radyografi yardımıyla geliştirip seksene yakın kutanöz vasküler ağ tanımlamıştır.

Bu gelişmeler sonrasında flep gelişimi evrelere ayrılmıştır. İlk evrede pediküllü deri flepleri yaygın olarak kullanılmıştır. Bu evre cerrahisinin altın çağını yaşadığı I. ve II. Dünya Savaşı'na denk gelmektedir. Gillies ve Filatov 1917'de tüp flepleri kullanmış ve sonrasında "Gillies-Filatov" tüp flepleri olarak anılmıştır.

İkinci evrede bölgesel aksiyel paternli flepler kullanılmıştır. Stark tarafından ilk pediküllü kas flebi alt ekstremitede osteomiyeliti bulunan bir defekt rekonstrüksiyonu için tanımlanmıştır. 1965'te Bakamjian deltopektoral flebi tanımlamıştır.

Üçüncü evrede ise aksiyel ve random paternli flepler arasındaki ayrım yapılmış, 1970'li yıllarda kas ve kas-deri flepleri hazırlanarak serbest doku transferleri yapılmıştır. 1970'li yılların başlarında Ian Taylor baş-boyun kanserleri defekt rekonstrüksiyonu amaçlı serbest fibula kullanımını düşünerek "serbest flep" terimini tanımlamıştır.1980'li yıllarda ise fasyokutanöz, osseöz ve osseokutanöz flepler tanımlanmıştır. Böylelikle flep terminolojisine aksiyel, random, direkt kutanöz, muskulokutanöz, fasyokutanöz, septokutanöz ve perforatör terimleri eklenmiştir. 1981'de Mathes ve Nahai vasküler anatomisine göre kas fleplerini tanımlayıp sınıflandırmıştır. 1987'de Taylor ve Palmer bölgesel köken arterden ayrılan tek bir arterin beslenmesini sağladığı deri, deri altı ve derin dokuların (kas, tendon, kemik, vb.) üç boyutlu kompozit doku bloğu olarak tanımlanan "anjiyozom" kavramını literatüre kazandırmıştır. Anjiyozom konsepti tanımlanmasından sonra bu yıllarda perforatör flepler de tanımlanmıştır. Serbest uyluk flebi 1984'te Song ve ark. tarafından, derin inferior epigastrik arter perforatör flebini 1989' da Koshima ve Sueda ark. tarafından tanımlanmıştır. Yine Koshima tarafından 1993'te sakral bası yarası

rekonstrüksiyonu için pediküllü gluteal arter perforatör flebi kullanılmıştır.1995 yılında ise Allen ve Tucker meme rekonstrüksiyonu için gluteal arter perforatör flebini serbest flep olarak transfer etmişlerdir.1995'te Angrigiani ve ark. latissimus dorsi flebini kas doku almaksızın torakodorsal arter perforatör bazlı deri ve subkutan dokuyu içerecek şekilde flep tanımlamışlardır. 2001 yılında perforatör ise aortanın dallarından ayrılan ve en sonunda cilde ulaşan herhangi bir damar olarak tanımlanmıştır. Hallock'a göre ise perforatör çıkış yerine bakılmaksızın deri fasyadan penetrasyonla geçerek süperfisyel plana giren herhangi bir damar olarak tanımlamıştır.

2.2.2.Flep Sınıflandırılması

Flepler hareket tiplerine, doku bileşimlerine, vasküler paternlerine göre sınıflandırılabilirler.

Vasküler Paterne Göre

- Random Paternli
- Aksiyel Paternli

Hareketlerine Göre

- Lokal flepler
  - Transpozisyon Flebi
  - İlerletme Flebi
  - Rotasyon Flebi
  - İnterpolasyon Flebi
- Uzak Flepler
  - Direkt flepler
  - İndirekt flepler
- Serbest flepler

Doku bileşimine Göre

- Kutanöz
- Fasyokutanöz flepler
- Fasya flepleri
- Muskuler ve Muskulokutanöz flepler
- Osseokutan
- Osseöz flepler
- Duyusal flepler

2.2.2.1.Deri Fleplerinin Kan Dolaşımına Göre Sınıflandırılması

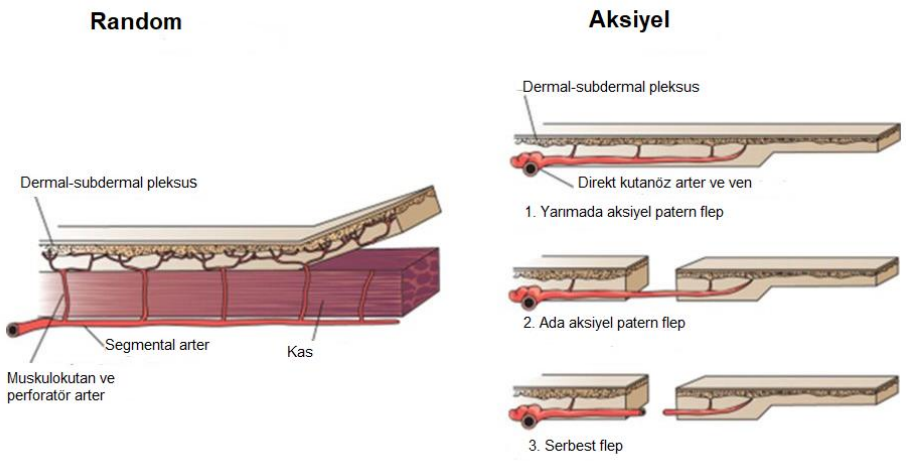
Deri flepleri kan dolaşımına göre random (rastgele) ve aksiyel (pediküllü) olarak sınıflandırılmıştır.

2.2.2.1.1.Random Dolaşım Paternli Deri Flepleri

Tanımlanmış bir arteriovenöz sistemi olmayan dermal-subdermal pleksustan beslenen fleplerdir. Bu nedenli flep boy en oranına göre hazırlanması gerekmektedir. Alt ekstremite gibi kanlanması az olan bölgelerde bu oran 1:1 iken yüz gibi kanlanması zengin olan bölgelerde ise bu oran 3:1, 4:1 olarak nekroz riski olmadan planlanabilir. [19,20]

2.2.2.1.2.Aksiyel Dolaşım Paternli Deri Flepleri

Belirli bir arteriovenöz sistemi olan fleplerdir. Bu fleplerde flep uzun ekseni boyunca uzanan direk kutanöz arter mevcuttur. Direkt kutanöz arterler kas ve subkutan doku arasında ilerlediğinden flep eleve edilirken proksimalde subkutan dokunun tamamını içermelidir. Direkt kutanöz arterin boyuna ek olarak dermal-subdermal pleksusla beslenen distal deri alanını da kapsaması nedenli random fleplere göre daha uzun planlanabilir. Venöz dönüş yüzeyel ve derin venler aracılığıyla gerçekleşir. Pedikül diseksiyonuna göre yarımada, ada ve serbest flep olarak hazırlanabilir. [19,20]

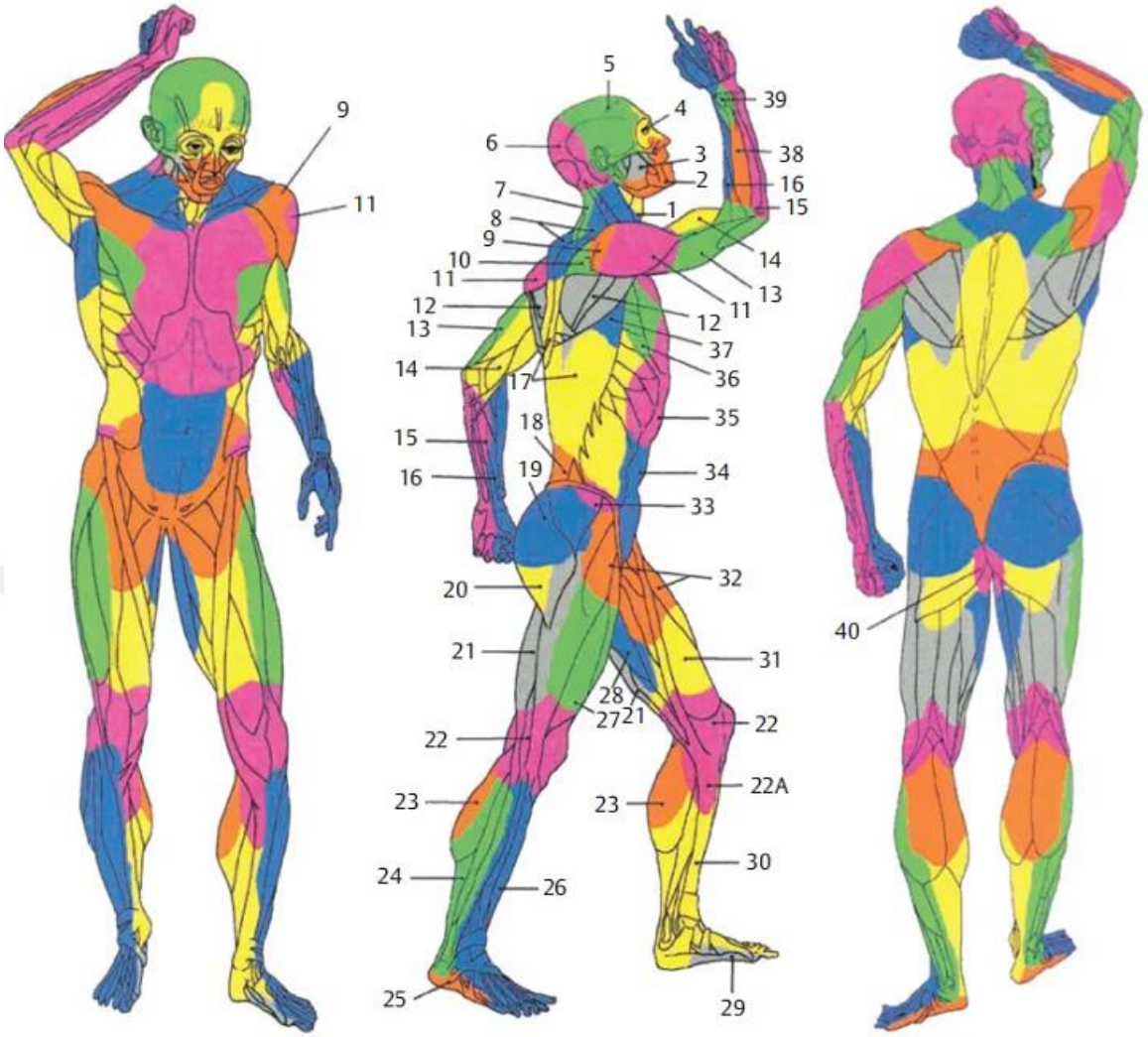


Şekil 4: Deri fleplerinin kan dolaşımına göre sınıflandırılması [21]

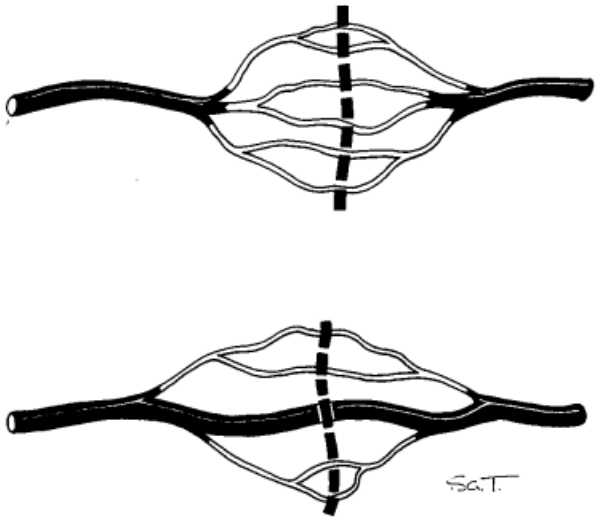
2.2.3.Anjiyozom Konsepti

Anjiyozom aynı kaynak arterden beslenen birleşik doku blokudur. Kaynak arter tanımlanan üç boyutlu doku bloku içerisinde deri ve altta yer alan yapıları besler. Derinin arter ve venlerinin bilinmesi flep ve insizyon planlanması aşamasında gereklidir.1889'da Manchot ve 1936'da Salmon tarafından bu damarların ayrıntılı çalışması yapılmış olup, 1987'de Taylor ve Palmer bu çalışmaları birleştirerek üç boyutlu vasküler alanlar olan anjiyozom alanlarını tanımlamıştır.[22,23]2009 yılında ise Saint-Cyr ve ark. perforazom tanımlamasını yapmıştır. Perforazom, tek bir perforatör tarafından beslenen 3 boyutlu kompozit doku olarak tanımlanmış olup, insan vücudunda 300'den fazla perforazom tespit edilmiştir.[24]

Her anjiyozom, arteriozom ve venozom adı verilen alt gruplarına ayrılırlar. Komşu anjiyozomlar arasında damar kalibrasyonun sabit ve kalın olduğu 'true (gerçek)' anastomozlar ve ince kalibrasyona sahip 'choke' anastomozlar bulunur. Bir arterin anatomik, dinamik ve potansiyel bölgeleri mevcuttur. Anatomik bölge, komşu anjiyozomla anastomoz yapmadan önceki alanı ifade ederken; dinamik bölge ise intravasküler boya enjeksiyonu sonrası boyanan alanları ifade eder. Potansiyel bölge tanımı ise delay (geciktirme) işlemi yapıldıktan sonra flebe dahil edilebilecek olan alanı ifade eder. Potansiyel bölge anatomik bölgeden daha büyük bir alandır, bunun nedeni geciktirme işlemi sonrası kalibrasyonu artmış choke anastomozlardır.



Şekil 5: İnsan vücudu anjiyozomları 1, Tiroid; 2, Fasiyal; 3, Bukkal internal maksiller; 4, Oftalmik; 5, süperfisyal temporal; 6, Oksipital; 7, Derin servikal; 8, Transvers servikal; 9, akromiyotorasik; 10, Supraskapular; 11, Posterior sirkumfleks humeral; 12,Sirkumfleks skapular; 13, Profunda braki;14, Brakiyal; 15, Ulnar; 16, Radyal; 17, Posterior interkostal; 18, Lumbar; 19,Superior gluteal; 20, İnferior gluteal; 21,Profunda femoris; 22,Popliteal; 22A, Desandan genikulat; 23, Sural; 24, Peroneal; 25, Lateral plantar; 26,Anteriortibial; 27, Lateral femoral sirkumfleks; 28, Adduktor profunda; 29, Medial plantar; 30,Posterior tibial; 31, Superfisyal femoral; 32, Ana femoral; 33, Derin sirkumfleks iliyak; 34, Derin inferior epigastrik; 35, İnternal torasik; 36, Lateral torasik; 37, Torakodorsal; 38,Posterior interosseoz; 39, Anterior interosseöz; 40, İnternal pudental[23]



Şekil 6: Komşu Anjiyozomlar arasında anatomik sınırı tanımlayan kesik çizgi ile choke anastomoz (yukarıdaki) ve gerçek anastomoz (aşağıdaki) şematik görünümü[25]

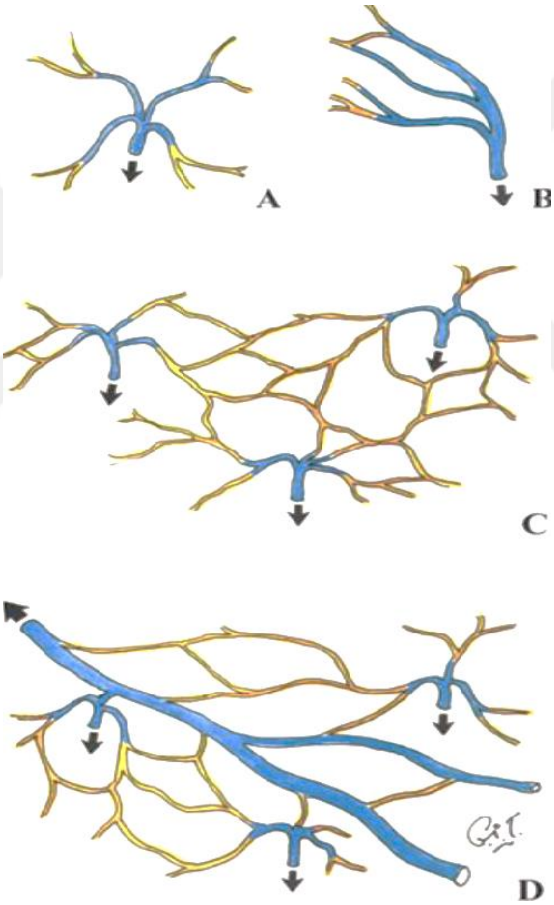
Choke anastomozlar, komşu Anjiyozomlar arasındaki kan akımını düzenlerler. Normal şartlar altında Şekil 6'da da görüldüğü gibi kalibrasyonları çok küçüktür.[26] Cerrahi geciktirme, iskemi, hemodinamik değişiklikler sonucu bu anastomozların kalibrasyonları genişler.

Cerrahi geciktirme sonrası damarlarda meydana gelen değişimlere baktığımızda sırası ile şunlar gelişir: [27]

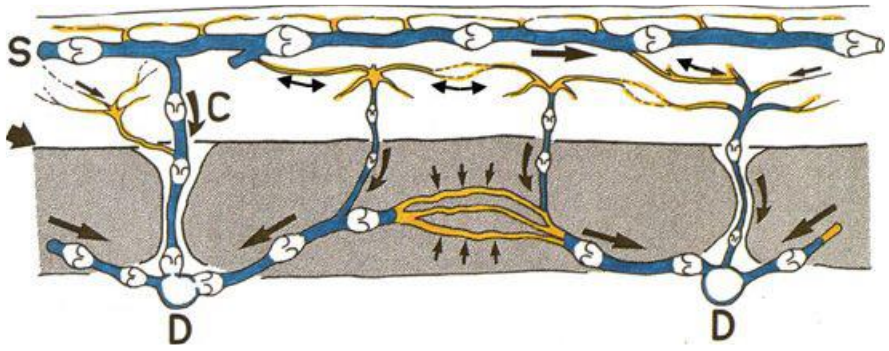
- Flepte bulunan tüm damarlarda 3. saatte vazospazm gelişirken bu durum yerini 24 saatte vazodilatasyona bırakır.
- 24-72. saatler arasında choke anastomozların çapı 2-4 katına çıkar ve endotelinde küçük defektler ile vazodilatasyona bağlı damar duvarında incelme meydana gelir.
- İlk 48-72. saatte damar duvarı histolojik olarak incelendiğinde; hücre sayısında artış olduğu ve tüm tabalarda hiperplazi olduğu görülür.
- 72. sa-7 gün arasında vazodilatasyon yavaşlamış olmasına rağmen devam eder ve damar duvarı bu hücre artışı nedeniyle kalınlaşır.
- 7. gün sonunda choke damarlarda bu şekilde kalıcı damar çap artışı meydana gelmiş olur.

2.2.4.Derinin Venöz Ağları

Venöz ağlar valvüler ve avalvüler (ossile) venlerden oluşan birbiriyle bağlantılı yüzeyel ve derin venöz sistemden oluşur.[28] Yüzeyel venöz sistem genellikle ekstremitelerde bulunup sinirlere eşlik ederler. Derin venöz sistem ise arterlere eşlik eden komitan ve komünikan venlerin oluşturduğu bir sistemdir. Valvüler venler, komşu arterlere eşlik eder ve tek yönlü akış izin verirler. Avalvüler venler ise komşu venöz bölgeler arasında akış ve basınç dengesine göre iki yönlü akıma izin vererek choke arterleri taklit ederler.



Şekil 7: Derinini venöz ağları. A, Temel venöz ünite; B, Farklı bir bölgede değişmiş bir venöz ünite; C, Bu venöz ünitelerin sürekli bir ağ oluşturmak üzere birbirleriyle bağlanmış hali; D, Yüzeyel venöz sistemin perforatör venler aracılığıyla derin venöz sistem ile birleşmesi, valvüler kısım mavi, avalvuler (ossile) kısım ise sarı renk ile gösterilmiştir.[28]



Şekil 8: Yüzeyel (S) ve derin (D) venöz sistemin birleşmesinin şematik çizimi. İki sistemi birbirine bağlayan geniş komunikan ven (C) ve alternatif bir yol oluşturan, perforatör artere eşlik eden komitan venleri. Kapaklı venler mavi, kapaksız venler sarı ile gösterilmiştir.[28]

2.2.5.Flep Fizyolojisi

Bir flebin eleve edilmesi ile kan akımında meydana gelen ani değişim sonucu hassas dengeler ile düzenlenen flep perfüzyonunda bozulmalar meydana gelir. Pedikülden gelen kan akımı dışında gelen kan akımının kesilmesi sonucu flep distal kısmında akut bir iskemi oluşur. Flep kenarlarının kesilmesi ile flepte ani bir sempatik innervasyon kaybı ve spontan nörotransmitter deşarjı sonucu vazokonstriksiyon oluşur. Flep kenarlarındaki insizyonlar ile endotelde meydana gelen hasar sonucu salınmış olan vazoaktif maddeler ve damarlarda oluşa tromboz nedenli flepteki iskemi daha da artar. Bu mekanizmalar nedenli flep distalinde ilk 12-18 saat kan akımı belirgin azalmış olur. Flebin uç kısmında oluşan bu iskemi ile meydana gelen değişimler sonucu flebin ne kadarının yaşayıp yaşamayacağının belirleyen temel aşama ilk 24 saattir. Flebin kompozisyonuna ağlı olarak değişmekle birlikte dolaşımında 6-12 saati geçen sürekli iskemi doku nekrozuna neden olacaktır. Sempatik sinirlerin kesilmesi sonucu salınmış olan nörotransmitterlerin etkisi ilk 12-24 saatte nörotransmitterin yıkımına bağlı olarak vazokonstriksiyon ortadan kalkar. Ancak flep distalinde meydana gelen ciddi iskeminin olduğu alanlarda iskemi reperfüzyon hasarı gelişir ve buna bağlı olarak dokuda nekroz görülür. Flep distalinin dolaşımının normale dönmesi pedikülden neovaskülarizasyon ve flebin adapte edildiği yataktan neovaskülarizasyon ve inoskülasyon ile olur.

Muskulokutan fleplerde derinin kan akımı kastan çıkan perforatörler aracılığıyla olması nedenli flep elevasyonu sonrası kan akımında erken ve devamlı bir artış gözlenirken random paternli bir deri flebinde ise erken bir düşüş söz konusudur. Flep elevasyonu sonrası ilk 6 gün boyunca muskulokutan fleplerdeki dokunun oksijen basıncı, random paternli deri fleplerinden yüksektir. Her iki flep tipinde de flep proksimalinde doku oksijen miktarı distale göre yüksektir. Proksimal ve distal arasındaki oksijen gradyan farkı random paternli fleplerde, aksiyel paternli muskuler ve muskulokutan fleplere göre daha fazladır.

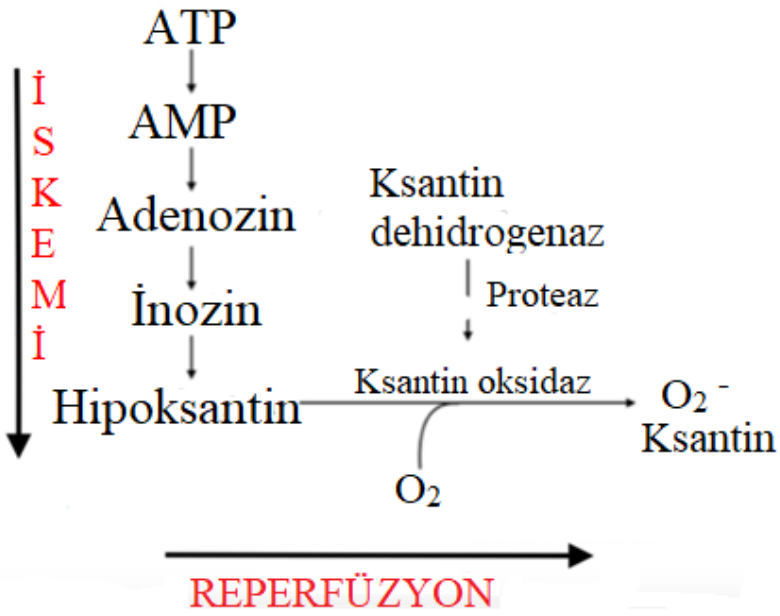
2.2.6.Flep Kaybı

Flep kaldırıldıktan sonra, akut sempatik innervasyon kaybı ve katekolamin salınımı sonucu vazokonstriksiyon meydana gelir. Flep distalinde meydana gelen bu iskemiyi toparlamak için meydana gelen vazodilatasyona rağmen pediküldeki düşük basınç yeterli doku perfüzyonu sağlanamayabilir. Flep distalindeki iskeminin nedeni arteriyel yetmezliktir. Yeterli arteriyel kan akımına rağmen yetersiz venöz dönüşte flep kaybına sebep olmakla birlikte serbest fleplerde venöz yetmezlik daha ön plana çıkar. Arteriyel ve venöz yetmezlik ile ilgili yapılan deneysel çalışmalarda venöz yetmezliğin flep kaybında daha zararlı olduğu saptanmıştır.[29,30] Yanlış planlanmış flep dizaynı, arteriyel veya venöz yetmezlik flep kaybına sebep olan 3 ana nedeni oluşturmaktadır. Serbest fleplerde meydana gelen arteriyel veya venöz yetmezlik en sık anastomoz hattında görülür ve nedeni genellikle yetersiz cerrahi tekniktir. [31]Uygunsuz flep dizaynı, iskemi reperfüzyon hasarı, sigara kullanımı vazokonstriktör ilaç kullanımı, sepsis, hipotansiyon, flep adaptasyonunun yanlış yapılmış olması, pedikülün katlanması ya da bası altında kalması veya hematom olması gibi durumlar da mikrovasküler akımda yavaşlamaya neden olarak tromboza neden olabilirler.

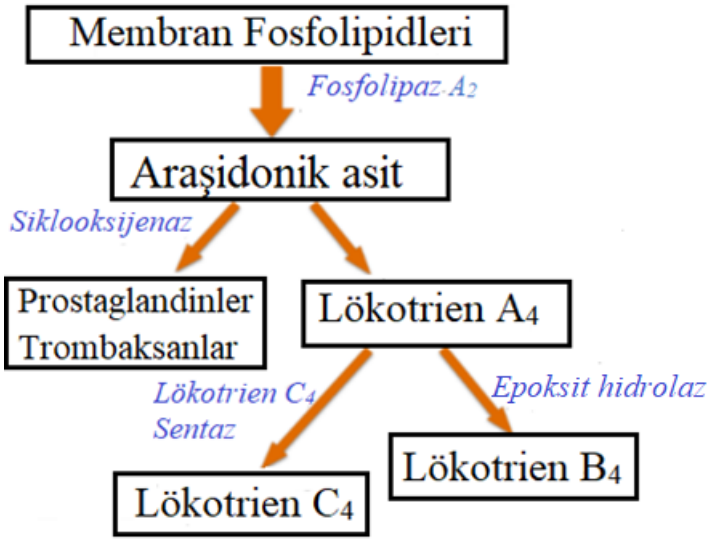
2.2.6.1.İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemik dokuda oksijen yetersizliğinden enerji üretimi anaerobik solunum üzerinden olur.[32] Buna sekonder oksijen, glikojen ve adenozin trifosfat (ATP) depoları hızla tükenip dokuda karbondioksit (CO_2) ve laktik asit birikir. İskemik dokuda ATP'den hipoksantin oluşur. [33]Hücre membranında bulunan ATP bağımlı iyon pompalarının çalışmaması nedeniyle hücre içi iyonize kalsiyum artar ve sitoplazmada

inaktif halde bulunan proteazları aktifleştirir. Bu proteazlar ksantin dehidrojenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Doku perfüzyonunun düzelmesiyle ortamda artan oksijen yardımıyla ksantin oksidaz hipoksantinle etkileşerek süperoksit (O_2^-) oluşturur. Süperoksit kararsız bir molekül olması nedeniyle hücreye direkt ve yeni başka oksijen radikalleri oluşturarak indirekt olarak hasar oluşturur.[34] İskemik dokunun reperfüzyonu sonucu oluşan serbest radikaller (süperoksit anyonu, hidrojen peroksit, hidroksil radikalleri) direkt endotel hasarı oluşturarak ve aynı zamanda buna bağlı nötrofilik kemoatraktan maddelerin salınımına neden olur. Bölgeye gelen nötrofillerden salınan serbest radikaller de olayın hızlanmasına neden olarak patogeneze katkıda bulunurlar. Reperfüzyon hasarı oluşumuna neden olan bir diğer mekanizma da fosfolipaz A2'nin hücre membranındaki lipidleri yıkarak araşidonik asitleri oluşturması sonucu görülür. İskemik dokuda lipoksijenazın aktiflenmesi sonucu lökotrien B4 oluşur ve bu molekül nötrofil degradasyonuna ve aynı zamanda süperoksit radikalleri oluşumuna neden olur. Nötrofiller ise lökotrien B4 oluşumunu artırarak inflamasyonu artırır. Siklooksijenaz yolunun aktiflenmesiyle de tromboksan A2 oluşur. Tromboksan A2 de damar üzerinde vazokonstriktör etki ederek trombosit agregasyonunu sonuç olarak trombozu etkiler.



Şekil 9: İskemik dokuda artan hipoksantin, reperfüzyon sonrasında ortama gelen oksijenle ksantin oksidaz varlığında reaksiyona girerek süperoksit (O_2^-) serbest radikalini oluşturur.



Şekil 10: Hücre hasarı sonucu oluşan araşidonik asit türevlerinin oluşumu

2.2.7.Flep Yaşayabilirliğini Artıran Faktörler

2.2.7.1.Ameliyat Öncesi Değerlendirme ve Uygun Cerrahi Teknik

Flep yaşayabilirliğinde en önemli unsurlar; doğru flep seçimi, düzgün flep dizaynı, alıcı sahanın hazırlığı, flep elevasyonunun titizlikle yapılması, flep adapte edilmesinin düzgün yapılması ve ameliyat sonrası uygun takiptir. Kötü cerrahi planlama ve teknikten kaynaklanan problemler hiçbir medikal tedavi ile düzeltilemez. Flep takibinin düzgün yapılması ve oluşabilecek sorunda anında müdahale edilmesi hayati önem taşır. Flep cerrahisinden önce hastanın medikal öyküsü, vücut sıcaklığı, sepsis varlığı gibi durumlar sorgulanır ve bu durumlar düzeltildikten sonra ameliyat planlanır. Sigara içiciliği sistemik vazokonstrüksiyon yaratıp flep yaşayabilirliğini tehlikeye atabileceğinden sigara kullanımı sorgulanıp cerrahiden haftalar öncesinde sigara kullanımı yasaklanmalıdır.[35] Hipotermi; mikrodolaşımda vazokonstrüksiyona neden olup doku perfüzyonuna neden olurken dokunun metabolik ihtiyacını azaltarak iskemi reperfüzyon hasarına karşı ise koruyucu etkiye sahiptir.[36,37] Hipoterminin olumlu etkisini reperfüzyon döneminde, nötrofil akümülasyonunun bloke olması ve nötrofil hasarının önlenmesiyle görürüz.[38,39] Reperfüzyon yapılan iskemik fleplere sıcak uygulama yapılmasının hatalı olduğunu ortaya koymaktadır. Flebin alıcı sahaya uygun yerleştirilmesi, uygun pansuman yapılması, postoperatif hasta pozisyonu ve

alıcı sahaya uygun pozisyon verilmesi oluşabilecek dolaşım problemlerinin önlenmesi açısından oldukça önemlidir.

2.2.7.2.Medikal Tedaviler

2.2.7.2.1.Antikoagülanlar

Dekstran: Bir polisakkarit olup volüm genişletici olarak üretilmesine rağmen zamanla trombosit agregasyon ve adezyonunu azaltması, kanama zamanında uzamaya sebep olduğu ve kan viskozitesini azaltarak kan dolaşımını olumlu yönde etkileri tespit edilmiştir. Mikrodolaşımı iyi yönde etkilediği gösterilmiştir.[40,41]
Aşırı volüm yüklenmesi, akciğer ödemi ve solunum distres sendromu gibi ciddi komplikasyonlarının bulunması nedenli kullanımı sınırlandırılmıştır.[42]

Heparin: Antitombin III'e bağlanıp Faktör X'u inhibe ederek etki eder. Venöz trombozu önlemede daha etkilidir. Sistemik kullanımı flep cerrahisinde hematom riski nedenli tercih edilmezken anastomoz esnasında lokal olarak (100 ünite/ml) kullanılmıştır. Hem anfraksiyone hem de düşük molekül ağırlıklı heparinin (DMAH) mikrodolaşımdaki perfüzyonu artırmasına rağmen kanama ve hematom riski sebebiyle sadece DMAH kullanımı önerilmiştir.[43]

Tombolitik Ajanlar: Plazminojeni plazmine çevirerek etki ederler. Streptokinaz ve ürokinaz ilk kuşak ilaçlardır. Sonrasında bunlara doku plazminojen aktivatörü (t-PA) ve asetil plazminojen-streptokinaz aktivatör kompleks (APSAC) eklenmiş olup bunlar mikrovasküler trombozların tedavisinde etkilidirler.

Medikal Amaçlı Sülükler: Sülükler salgıladıkları hirudin sayesinde fibrinojenin fibrine dönüşümüne engelleyerek antikoagülan aktivite görür. Ayrıca salgıladıkları hyalüronidaz sayesinde vazodilatasyon ve hirudinin dokulara yayılmasını sağlarlar. Sülüklerin kan emerken yaptığı mekanik dekompresyon da tedavideki etkinciliğini artırmaktadır. Yan etkilerine bakıldığında ciddi kanama, anafilaksi ve Aeromonas hidrofila enfeksiyonu görülür. Aeoromonas hidrofila enfeksiyonuna karşı fluorokinolon grubu antibiyotik kullanılır.[44]

2.2.7.2.2.Vazodilatatörler

Kalsiyum Kanal Blokörleri: Damar düz kasının daralmasına ve kasılmasına neden olan kalsiyum iyonlarını bloke ederek vazodilatasyon sağlarlar. Topikal kullanımda veya intravenöz kullanım ile ilgili yapılan deneysel flep çalışmalarında flep yaşayabilirliğini artırdığı görülmüş olsa da yeterli kanıt bulunmamaktadır.

Topikal Nitrogliserin: Venler üzerinde daha belirgin vazodilatasyon oluşturması nedeniyle venöz dolaşıma olan etkisi daha belirgindir. Transdermal olarak kullanımda flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir.[45]

Topikal Lidokain ve Pentobarbital: Travmaya sekonder oluşmuş vazospazmın çözülmesinde etkilidir.

2.2.7.2.3.Antienflamatuarlar

Steroidler: Membran stabilizatörü olması ve antienflamatuar etkisi nedeniyle reperfüzyon hasarını önlemesine bağlı olarak flep yaşayabilirliğine etki eder.

Asetil Salisilik Asit (ASA): Siklooksijenaz enzimini inhibe ederek Tromboksan A2 üretimini inhibe eder. Ancak çok yüksek dozlarda uygulanması güçlü vazodilatatör olan prostasiklin oluşumunu da inhibe eder. Prostasiklin oluşumunu inhibe etmeden trombaksan A2 üretimini inhibe eden doz 50-100 mg arasıdır.[46] Deneysel çalışmalarda preoperatif kullanılan aspirin venöz anastomoz trombozunu azalttığı ve kapiller dolaşımı iyi yönde etkilediği gösterilmiştir.[47]

2.2.7.2.4.Serbest Oksijen Radikali Oluşumunu Önlemeye Yönelik Tedaviler, Antioksidanlar

Random paternli fleplerde süperoksit dismutazın (SOD) flep yaşayabilirliğini anlamlı şekilde artırdığı ve ksantin oksidaz inhibitörü allopurinol ve serbest oksijen radikali temizleyici görevi yapan desferoksaminin de olumlu sonuçlar alındığı gösterilmiştir.[48]

2.2.7.3.Cerrahi Delay (Flep Geciktirilmesi) ve İskemik Ön koşullandırma

Flep elevasyonundan önce flep kan akımının kısmi olarak kesintiye uğratılarak flep vasküler yoğunluğunun artırılması işlemi delay prosedürü olarak adlandırılır. Burada amaç flep distalinde yaşayabilen random cilt adasının artırılmasıdır.
Geleneksel delay işleminde flep eleve edilmeden her iki yanına insizyon yapılır, 2 ya da 3 hafta beklendikten sonra flep distali eleve edilerek flep distali transfer edilir.
Zamanla "iskemik ön koşullandırma" adı verilen dokunun yaşayabilirliğini bozmayacak sürede iskemi yaratılması ile gerçekleştirilen cerrahi delay yöntemler de tanımlanmıştır. Bu yöntemde amaç flep elevasyonundan sonra meydana gelecek olan uzun süreli iskemiye toleransı artırarak flep kaybını önlemektir. İlk kez köpeklerde yapılan deneyde köpek kalbindeki afferent damarlarda meydana getirilen kısmi oklüzyonlar sayesinde zamanla meydana gelen miyokard hasarının azaltıldığı gösterilmiştir.[49] Bu yöntemin muskuler ve muskulokutan fleplere de uygulanabildiği deneysel çalışmalarla gösterilmiştir.[50]

Günümüzde cerrahi delay prosedürü, flebin insizyon yapılarak kısmi elevasyonuyla ya da flep pediküllerinin bir ya da birkaçının bağlanarak flep kan akımının azaltılmasıyla gerçekleştirilir.

Delay fenomenini açıklamak için birçok teori ileri sürülmesine rağmen hiçbir teori tam anlamıyla tek başına açıklamaya yetmemiştir. Delay fenomenine bu teorileri hepsi belli oranda etki göstermektedir.[51,52]

-Artmış Aksiyel kan akımı: Random paternli bir flebin periferi ve tabanından gelen kan akım desteğinin engellenmesi flebin uzun aksı boyunca gelen kan akımını artıracaktır.

-İskemiye tolerans: İlk delay işlemi sonrasında meydana gelen metabolizma sonucu hücreler enerji ihtiyacını azaltmaları daha iyi bir mikro sirkülasyona sahip olmaları ve daha az oksijen radikali üretmeleri sayesinde hücre iskemiye daha dayanıklı hale gelir ve sonraki operasyonda doku nekrozu daha az görülür.

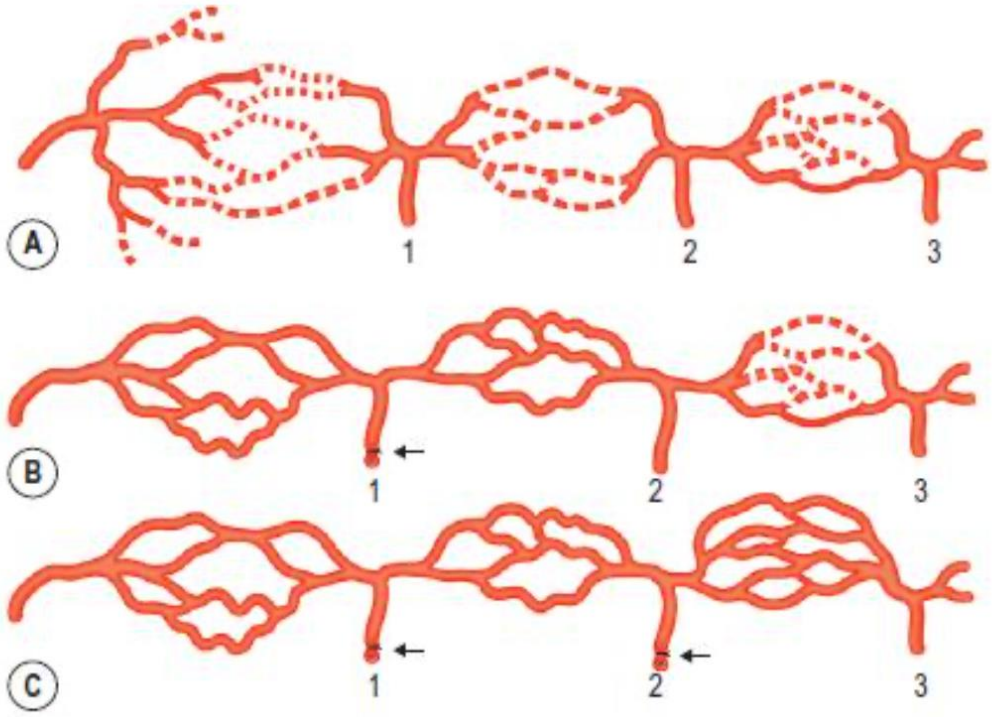
-Sempatektomi-Vazodilatasyon: Flep etrafındaki sempatik afferentlerin kesilmesi sonucu yaklaşık 48 saat sonra vazodilatasyon ve buna bağlı kan akımında artış meydana gelir.

-Flep İçi Şant Hipotezi: Bu teoriye göre sempatik liflerin kesilmiş olması sonucu arteriovenöz anastomozlar prekapiller sfinkterlere göre daha fazla dilate olur ve bunun sonucunda kapiller yatağı bypass eden besleyici olmayan kan akımında artış görülür. İkinci aşama cerrahide kesilen daha az sempatik liften dolayı besleyici olmayan kan damarlarına giden kan akımında da azalma görülür ve flep yaşayabilirliğinde artış görülür.

-**Hiperadrenerjik durum**: Cerrahi nedenli vazokonstrüksiyona neden olan epinefrin, norepinefrin gibi vazokonstriktör ajanların konsantrasyonunda artış gözlenir. Delay işleminden sonra oluşan iskemi flepte nekroz oluşturacak kadar yeterli değildir. Delay sonrası nihai cerrahi işleminden önce vazokonstriktör maddelerin konsantrasyonu normale döner ancak yapılacak nihai cerrahi nedenli tekrar bir artış gözlenir. Meydana gelen bu artış delay yapılmayan flepte görülen artıştan daha azdır bu sebeple flep distalinde görülen nekroz daha az olacaktır.

-Yeni Damar Oluşumu: Yapılan delay işlemi sonrası dokuda meydana gelen göreceli iskemi anjiyogenezi indükleyerek, flep transferi öncesinde flepte damarlanma artışına yol açar.

- "Choke" Damarları: Delay işlemi uygulanması komşu Anjiyozomlar arasında bulunan choke damarların dilate olmasını sağlayarak kan akımının artmasına sebep olur.



Şekil 11: Choke anastomozların iskemiye cevabı

2.2.7.4.Süperşarj ve Turboşarj

Aksiyel paterni bir flebin sekonder pedikülüne mikrocerrahi yolla anastomoz yaparak flep kan dolaşımının arttırılmasıdır. Anastomoz arteriyel ya da venöz olabilir; venöz anastomoz yapılması durumunda venöz süperdrenaj olarak adlandırılır.[53] Turboşarj ise mikrocerrahi yöntemlerle flebin kendi damarların yine flep içerisindeki bir başka damara aktarılması ile olan yöntemi tanımlamaktadır.[54]

2.2.8.Flep Takibi

Serbest doku transferlerinde doku kaybı %5'ten az olarak rapor edilmesine rağmen pedikülün tromboz ihtimali daha yüksektir. Pedikül trombozundan sonra flebin kurtarılma ihtimali %36 ile %70 arasında değişmektedir.[55] Flep elevasyonundan sonraki flebin kurtarılma ihtimali ilk 24 saat daha yüksek olması nedenli ilk 24 saat, saat başı, sonraki 48 saat ise 4 saatte bir olacak şekilde kontroller yapılır.[56]

2.2.8.1.Klinik Gözlem

Klinik gözlem flep takibinde en etkili ve altın standart yöntem olmasına rağmen flep yaşayabilirliğinin renk, kapiller dolum ve ısıya bakılması yanıltıcı olabilmektedir. Flepte küçük bir insizyon yapılarak kanama bakılması en doğru sonucu veren klinik testtir. Flep takibinde arteriyel yetmezlik ve venöz yetmezlik ayırımında çeşitli klinik bulgular vardır.

Arteriyel yetmezlik gözlenen flep rengi soluk, benekli veya beyaz olabilir. Kapiller dolum yavaşlamış, doku turgoru azalmış ve dermal kanatma yapıldığında az miktarda kanama veya serum akışı izlenebilir. Flep genellikle soğuktur.

Venöz yetmezlikte ise deri rengi siyanotik, mavimsi ve koyu renkte olabilir. Kapiller dolum süresi hızlanmış, deri gergin ve turgoru artmış olarak izlenir. Dermal kanatma yapıldığında hızlı ve koyu renkli bir kanama görülür. Flep ise soğuktur.

2.2.8.2.Sıcaklık Monitörizasyonu

Serbest doku transferinde diferansiyel termometreyle yapılan ölçümlerde sıcaklık farkının 3 derecenin üzerinde olması anlamlı kabul edilir.

2.2.8.3.Vital Boya Ölçümleri

-Fluoresein bolus olarak enjekte edilip yeterli süre beklenmesi sonrası Wood lambasıyla bakılarak değerlendirilebilir.

-İndosiyanin yeşili (ICG): İndosiyanin yeşili (ICG) kullanılarak yapılan intraoperatif lazer anjiyografi, yüzeysel kan akışını görsel olarak değerlendirmek için kullanılabilen vasküler bir görüntüleme metodolojisidir. 1990'lı yılların sonlarında indosiyanin yeşili ve lazerle görüntülemeyi plastik cerrahide ilk transpozisyon fleplerinde perfüzyonu şüpheli bölgelerin değerlendirilmesinde kullanıldığını görürüz.[57] Sonrasında ise serbest fleplerin preoperatif, peroperatif ve postoperatif döneminde flep perfüzyonunu değerlendirme amacıyla kullanılmıştır. ICG'nin emilim ve yayılım dalga boyları sırasıyla 805 ve 835 nanometredir.[58] İCG periferik bir venden bolus olarak enjekte edilmesinden sonra 15-30 sn sonra subdermal pleksusta boyanma görülür. 30-60. saniyelere bakıldığında boya venüllerde görülür. Plazma yarı ömrü 3-4 dakikadır. Lazer ışını, deride 3-5mm derinliğe penetre olur ve kızılötesi optik filtresi

olan bir kamera aracılığıyla görüntü kaydedilir. [59]Kamerada iskemik alanlar karanlık kalırken, subdermal pleksus floresan parlak görülür. Perforatörlerin bulunduğu alan ise daha parlak gözlenir. Enjeksiyondan 3-4 dakika sonra flep alanında parlama flep çevresinden fazla ve klirensinde azalma söz konusu ise venöz yetmezlik riski yüksektir. [60] İCG anjiografi bize flep planlamada, perforatör seçiminde oldukça yardımcıdır. En baskın perforatör ICG anjiografide daha parlak görülür bu sayede en baskın perforatör bazlı flep tasarlanarak flep distalinde görülen iskemik alan azaltılabilir.[61]

2.2.8.4.Doppler ile değerlendirme

Ultrason yüksek güvenilirlikle noninvazif bir şekilde devamlı flep monitörizasyonuna olanak sağlar. Ancak kantitatif olmaması, tek bir bölgeden bilgi sağlaması ve hastanın hareketlerine hassas olması dezavantajıdır.[62]

2.2.8.5.Metabolik değerlendirme

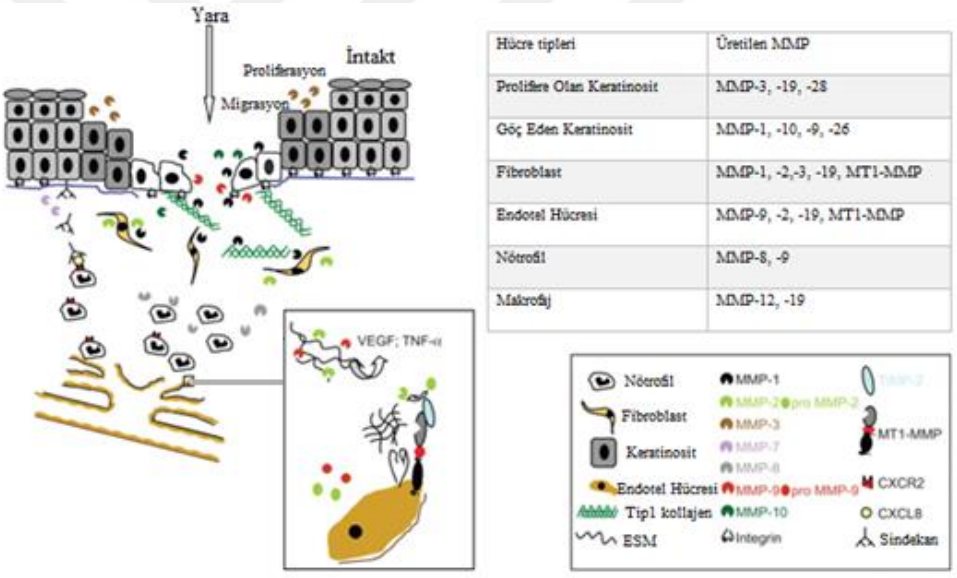
Transkutanöz parsiyel oksijen basıncının ölçümü yapılarak veya fotopletismografi ile mikrodolaşımdaki sıvı hacminin ölçülmesi bu amaçla kullanılan yöntemlerdir.

2.3.Matriks Metalloproteinazlar

Ekstrasellüler matriks, hücrelerarası boşluklarda bulunan ve hücrelerarası etkileşime olanak sağlayan dinamik bir yapıdır. Hücre matriks etkileşimi ekstraselüler proteazlar tarafından düzenlenmekte olup, ekstrasellüler matriks yapısının bileşimi ve bütünlüğünü düzenleyerek, matriks molekülleri tarafından oluşturulmuş olan sinyallerin kontrolü, hücre proliferasyonu, farklılaşması ve ölümünde temel rol oynar. [63] Bu enzimler içerisinde en önemlilerinden birisi de matriks metalloproteinazlardır. (MMP) MMP'ler çinko ($Zn^{++)}$ ve Ca^{++} bağımlı endopeptidazlardandır. Endotel hücreleri, makrofajlar, fibroblastlar, damar düz kas hücreleri, T lenfositler, trombositler, kondrositler, keratinosit, epitel hücreleri, osteobleastlar gibi çok çeşitli hücre türlerinden değişik MMP'ler üretilir. Canlıda normal fizyolojinin sürdürülmesi için MMP'ler ve bu enzimin spesifik endojen doku inhibitörü (TIMP'ler) arasında sürekli bir denge vardır.[64] MMP'ler ve TIMP'ler dokuda düşük düzeyde bulunur ve

birçok biyolojik olayda aktif rol oynarlar. Bu fizyolojik olaylar arasında anjiyogenezi, inflamasyon, kemik remodellingi, immun cevap gelişimi, embriyonik gelişim, blastosit implantasyonu, organ morfogenezi, sinir hücre gelişimi, ovülasyon, servikal dilatasyon, postpartum uterin involüsyonu, endometriyal siklus ve saç folikülü siklusu sayılabilir.[65]

MMP'ler ilk olarak 1949 yılında tanımlanmış ve tümör büyümesinde stromal oluşumu ve kan damarlarının artırdığı düşünülmüştür. Son yapılan çalışmalarda MMP enzim ailesinin kanser ve metastaz, serebral iskemi, kalp yetmezliğinde, ateroskleroz, artrit, nefrit, gastrointestinal ülser, peridontal hastalık, kornea ülseri, deri ülseri, multipl skleroz, nörolojik hastalık, Alzheimer hastalığı, karaciğer fibrozu, fibrotik akciğer hastalığı, amfizem, kan beyin bariyerinin yıkılması üzerinde belirgin etkileri olduğu gösterilmiştir. [65]



Hücre tipleri	Üretilen MMP
Proliferе Olan Keratinosit	MMP-3, -19, -28
Göç Eden Keratinosit	MMP-1, -10, -9, -26
Fibroblast	MMP-1, -2,-3, -19, MT1-MMP
Endotel Hücresi	MMP-9, -2, -19, MT1-MMP
Nötrofil	MMP-8, -9
Makrofaj	MMP-12, -19

Şekil 12: Matriks metalloproteinazların (MMP'ler) farklı fonksiyonları yara iyileşmesine ve anjiyogeneze katkıda bulunur. Sağlıklı ciltte, MMP'lerin bazal ekspresyonu düşüktür, ancak yaralanmayı takiben, salgılanan ve membrana bağlı birçok MMP'nin etkileşimi, yara iyileşmesine doğrudan veya dolaylı olarak katkıda bulunur. Örneğin, MMP-1 yara kenarlarındaki keratinosit göçünü güçlü bir şekilde etkilerken, MMP-7 nötrofil alımını düzenler. Endotel hücrelerinin migrasyonu ve proliferasyonunun bir sonucu olan yaraya bağlı neoanjiyogenez, jelatinazlar MMP-2 ve -9 yoluyla vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve tümör nekroz faktörü

(TNF) α salınımı tarafından yönlendirilir. BM: bazal membran; KC: keratinosit; TIMP: matriks metalloproteinazın doku inhibitörü; ECM: hücre dışı matris.[66]

2.3.1.Matriks Metalloproteinazların Yapısı ve Sınıflandırılması

MMP'ler belirli ortak yapısal özellikleri vardır. MMP'lerin tümü N-terminal ucunda predomain adı verilen bir lider dizilim içerir. Bu lider dizilim enzimin salgılanması için gerekli olan etiketlemeden sorumludur ve salgılanma sonrası kaybolur. İkinci kısım olan pro-domain kısmı ise enzimin inaktif halde kalmasından sorumludur. Enzim aktive olduktan sonra kaybolur. Üçüncü kısım ise Zn++ bağlayan kısım olan katalitik kısımdır. Katalitik domain Zn^{++} haricinde Ca^{++} bağlayan kısımda içererek enzim stabilitesi ve aktivitesinden sorumludur.[65]

MMP'ler hücre dışı proteinler olmasına rağmen MMP-1, MMP-2 ve MMP-11'in hücre içinde de bulunduğu ve hücre içi proteinler üzerinde de etki ettiği bildirilmektedir. Matriks metalloproteinazlar kemik remodellingi, embriyonik gelişim, hücre göçü, yara iyileşmesi, doku rezorpsiyonu, blastokist gömülmesi, organ yapısının gelişimi, sinir büyümesi, ovulasyon, servikal genişleme, endometrial döngü, anjiyogenez, apoptozis gibi bazı fizyolojik süreçlerde önemli rol oynarlar. MMP seviyesinin bozulması durumunda artrit, kanser, ateroskleroz, ülser, fibrozis ve anevrizma gibi hastalıklara yakalanma olasılığında artış görülmektedir. MMP'lerin etkinliği matriks metalloproteinaz doku inhibitörü (TIMP) adı verilen inhibitörler aracılığıyla düzenlenir. Günümüzde tanımlanmış 24 farklı MMP bulunmaktadır. [67]
MMP'ler etki ettiği substrata, domain içeriğine göre gruplara ayrılır. Bunlar; kolajenazlar, jelatinazlar, stromelisinler, matrilizinler, membran tipi MMP'ler, diğer MMP'lerdir.

Kolajenazlar: Bu grupta MMP-1, MMP-8, MMP-13 ve MMP-18 yer alır. Bu grup enzim ekstrasellüler matrikste bulunan tip I, II, III kolajenleri parçalayabilir. MMP-1; uygun şartlarda interstisyel tip I, II ve III kolajeni ve ayrıca kolajen olmayan bazı substratları da sindirir. MMP-8 (insan nötrofil interstisyel kolajeniz) ve MMP-1 yapısı çok benzerdir. Tip I ve III kolajen üzerine etkilidir. MMP-13 ise daha çok tip II kolajen üzerine etkilidir.

Jelatinazlar: Bu grupta denatüre olmuş kolajenleri ve jelatinleri sindiriminde rol alan MMP 2 (jelatinaz A) ve MMP 9 (jelatinaz B) adı verilen enzimler yer alır. Bu

enzimler kolajen, laminin ve jelatine bağlanan katalitik bölgenin içinde bulunur. Yapısında üç defa tekrarlayan tip II fibronektin bölgesi bulundurur. Bu yapı sayesinde bu grup enzimler, jelatin ve kolajene yüksek ilgi ile bağlanır ve böylece proteolitik etkinliklerini artırırlar. Tip I, Tip II ve Tip III kolajende MMP-2 tarafından proteolize uğrar. MMP'ların endotelial hücreler üzerinde çok fazla etkisi olduğu bilinmektedir. MMP'lar endotelial hücre migrasyonunda ve neovaskülarizasyonda tüp formasyonun oluşumunda oldukça önemli bir role sahiptirler. [68] Bazı MMP'ların anjiyogenezisin endojen inhibitörleri olan anjiyostatin ve endostatinin prekürsörlerinin salınımına yol açarak anjiyogenezisi engellediği bildirilmiştir.[69] Daha önce yapılan deneysel çalışmada düşük doz lazer terapi uygulanan flepte anjiyogenezin arttığı, bununla birlikte vasküler endotelial growth faktörün arttığı, MMP-2 nin ise azaldığı moleküler düzeyde gösterilmiştir.[70]

Bazal membranların ana yapıtaşı tip IV kolajendir ve bazal membranın içerdiği toplam proteininin %40-65'ini oluşturur. İnterstisyel kolajenazlar tip IV kolajen üzerinde etki gösteremezler. Tip IV kolajenin helikal bölümünü enzimatik sindirilmesinde rol alan kollajenaz ilk kez fare melanoma hücre kültürlerinde tanımlanmıştır. Daha sonraki araştırmalarda bu kollajenazın insan fibroblast jelatinaz-A ile aynı olduğu anlaşılmıştır. Jelatinaz-A interstisyel kollajenazların başlattığı kolajen yıkımını tamamlar. Jelatin sindiriminde interstisyel kollajenazlara göre 100 kat daha hızlı enzimatik işlev görür. İnsan makrofaj, granülosit, keratinosit ve diğer bazı hücre türleri glikoprotein yapıda olan jelatinaz-B'nin üretimini sağlarlar.

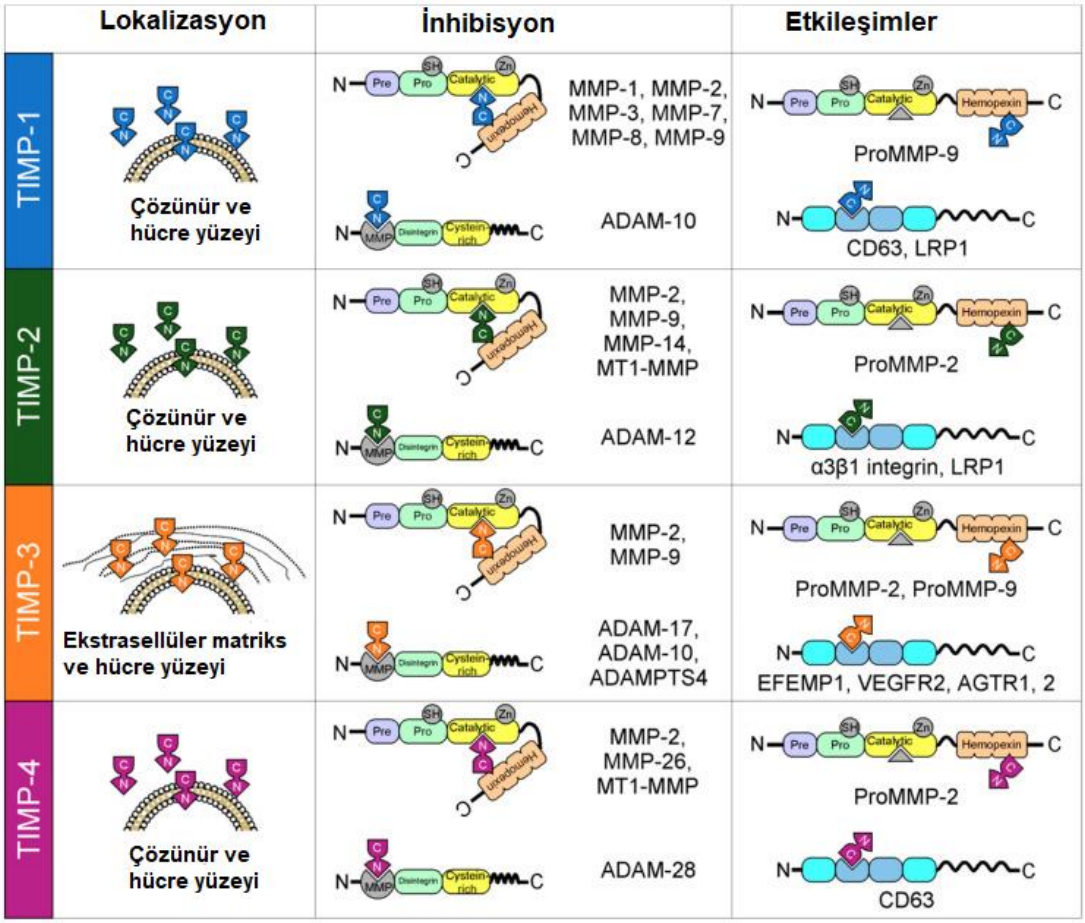
Stromelizinler: Stromelizin 1 (MMP-3) ve stromelizin 2 (MMP-10) 'nin substratları benzer yapıda olmasına rağmen, MMP-3 MMP-10'a göre proteolitik etkinliği bakımında daha potenttir. MMP-11'in, bir diğer isimlendirilmesi stromelizin 3 olmasına rağmen çünkü sekansı ve substrat özgüllüğü MMP-3 ve 10'dan farklı olmasından dolayı diğer MMP'ler içinde sınıflandırılır. Stromelizin 1 fibroblastlardan üretilir ve hücresel fibrinolizde de önemli işlevi olduğu düşünülmekle birlikte başlıca substratları proteoglikanlar, tip IV kollajen, laminin ve fibronektindir. Stromelizin-2, stromelizin-1'nin substratları aynı olmasına rağmen bulundukları dokular farklıdır. Yara iyileşmesi sırasında ise keratinositlerde her iki enzimde eksprese edilir. Stromelizin-3 α1-tripsin inhibitörünü parçalar ancak diğerlerinin etki ettiği ESM bileşenlerine etkisi yoktur. Fizyolojik rolü ve etki mekanizması kesin olarak

bilinmemekle birlikte epitelyal tümörlerin stromasında çok miktarda bulunur. Bu sebeple enzimin serin proteaz inhibitörlerini baskılayarak plazmin gibi enzimlerin matriks proteinlerini yapıtaşlarına ayrılmasını sağladığı düşünülmektedir.

2.3.2.Metalloproteinaz İnhibisyonu

Matriks metalloproteinazların inhibisyonunda özel doku inhibitörleri TIMP'lar tanımlanmıştır. Bağ doku metabolizmasını düzenleyen temel proteinler TIMP'lerdir. Vücut sıvılarında ve pek çok dokuda yer alırlar. Genel olarak TIMP ailesi MMP'lere irreversibl ve non-kovalent biçimde bağlanır. Bu şekilde latent enzim formunun aktivasyonunu ve katalitik aktivitenin sürdürülmesini de inhibe edip substrata bağlanmayı engelleyerek etki gösterir. Bu şekilde TIMP'ler MMP enzim aktivitesini ve MMP/TIMP dengesini belirli bir seviyede tutarlar. TIMP'ler vasküler düz kas hücreleri, endotel hücreleri, kan hücreleri, bağ dokusu hücreleri ve makrofajlar tarafından sentezlenir. İnsanda günümüzde tanımlanmış 4 adet TIMP türü vardır. TIMP 1-2-3-4 şeklinde tanımlanmış 4 alt türü olan TIMP'lar %41 ila %52 oranında sekans benzerliği göstermektedir.[71]Fonksiyonel olarak benzerlik göstermekle birlikte farklı dokularda oranları değişmektedir. Bunun yanında genel proteinaz inhibitörleri olarak bilinen a2-makroglobulin, heparin, tetrasiklinler ve C-reaktif proteini de MMP inhibitörü etki göstermektedir. TIMP aktivitesi için bütünlüğünün korunmuş olması gereklidir. MMP ve TIMP'ler arasında bulunan oran çeşitli fizyolojik ve patolojik süreçlerde değişiklik gösterir.[72] Embriyogenez ve üreme, tümöral kitlelerin invazyon süreçleri, dermal yaşlanma, kemik oluşumu, eklem hastalıklarında MMP az ilişkileri ortaya konmuştur.

Tetrasiklin analogları, non-selektif MMP inhibitörleri olarak kabul edilebilir. MMP molekülünün Zn++ içeren aktif bölgesine bağlanarak enziminin yapısında değişiklik oluşturarak enzimin aktivitesini kaybetmesine neden olurlar.



Şekil 13: Matriks metalloproteazların (MMP'ler) ve matriks metalloproteinazların doku inhibitörleri (TIMP'ler) arasındaki lokalizasyon ve etkileşimler. Tüm TIMP'ler salgılanır, ancak matrise yalnızca TIMP-3 dahil edilir. Yapısal olarak, TIMP'ler yan yana paketlenen iki etki alanından oluşur (N-terminali ve C-terminali etki alanları). N-terminal etki alanı bazen "engelleyici etki alanı" olarak adlandırılır. TIMP-1, MMP-1-3 ve MMP-7-9'u inhibe eder; TIMP-2, MMP-2, MMP-9, MMP-14 ve membran tipi matris metalloproteinaz 1'i (MT1-MMP) inhibe eder; TIMP-3, MMP-2 ve MMP-9'u inhibe eder ve son olarak, TIMP-4 MMP-2, MMP-26 ve MT1-MMP'yi inhibe eder. Ek olarak, TIMP'ler MMP'lerin proformları ile inhibitör olmayan bir şekilde etkileşime girerler ve ayrıca hücre yüzey reseptörlerine doğrudan bağlanarak MMP inhibisyonundan bağımsız işlevlere sahiptirler.[5]

Tablo 1: Sentetik MMP inhibitörlerinin sınıflandırılması[73–77]

SENTETİK İNHİBİTÖR	SINIFI	SELEKTİVİTE
BB-94 (Batimastat)	Peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 7, 9
BB-2516 (Marimastat)	Peptido-mimetik	MMP-1, 2, 7, 9
AG3340 (Prinomastat)	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 3, 9, 13
Ro 32-3555 (Trocade)	Non-peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 9, 13
RS-130 830	Non-peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 7, 13
BAY 12-9566 (Tanomastat)	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 3, 9
BMS-275291 (Rebimastat)	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 9
CP-471 358	Non-peptido-mimetik	MMP-2, 3, 8, 9, 12, 13, 14
CGS-27023A (MMI-270)	Non-peptido-mimetik	MMP-1, 2, 3, 7, 9
AE-941 (Neovastat)	Köpek balığı kartilaj ekstresi	MMP-1, 2, 7, 9, 12, 13
COL-3 (Metastat)	Sentetik tetrasiklin türevi	MMP-2, 9
Doksisiklin (Periostat)	Sentetik tetrasiklin türevi	MMP-1

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Deney hayvan modelinde oluşturduğumuz bu deneysel çalışma, Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Etik Kurulu'ndan 18/05/2022 tarih ve 2022/06/06 numaralı etik kurul onayı alındı. Çalışmamızın cerrahi bölümü, ratların barındırılması ve sakrifiye edilmesi işlemi Dokuz Eylül Üniversitesi Hayvan Deneyleri Laboratuvarında yapılmıştır. Çalışmamızın SPY görüntülemesi Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında yapılmıştır. Çalışmamızın histomorfolojik değerlendirilmesi, örneklerin ışık mikroskop altında incelenmesi ve uygun histolojik yöntemlerle immunhistokimyasal incelemesi Dokuz Eylül Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

3.1.Kullanılan Hayvanlar ve Hayvanların Bakım ve Barınma Koşulları

Bu çalışmada Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan ağlanmış olan 32 adet 12 haftalık, 250-350 gr. ağırlığında, erkek Wistar Albino cinsi rat kullanılmıştır. Deney hayvanları internasyonel hayvan deney bakım ve deney kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşullarında (sıcaklık 23 ±2 °C, nem %45-65, 12 saat gündüz/gece siklusu) kafeslere alınmıştır. Deney Hayvanları, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında standart koşullarda beslenerek takip edilmiştir.



Şekil 14: Ratların barınma kafesi ve etiketlenmesi

3.2.Cerrahi Planlama

Ratlar rastgele olarak her grupta 8’er adet olmak üzere dört gruba ayrıldı. Hayvan modeli olarak daha önce bu tür çalışmalarda kullanılmakta olan rat sırt bölgesinden kaldırılan kaudal bazlı 3×9 cm ebatlarında McFarlane flepleri kullanıldı. Kontrol grubunda random paternli flep modeline ek tedavi uygulanmadı. Deney grupları oral Zn tedavisi, oral doksisiklin tedavisi ve subkutan marimastat tedavisi verilecek gruplar olarak planlandı. Flep eleve edilmeden önce gruplar oluşturulup tedaviler uygulandı.

3.2.1.Grup 1: Kontrol Grubu (n:8)

Bu grupta 3×9 cm ebatlarında flep eleve edilip tekrar yerine 3.0 ipek sütür ile sütüre edildi. Günlük povidon iyot ile açık pansuman yapıldı. Postoperatif analjezi için

2 gün boyunca parasetamol enjeksiyonları yapılacaktır Yedinci gün sonunda fleplerin fotoğrafları çekildi, İndosiyanin yeşili verilerek SPY cihazı ile kan dolaşımı bakıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi. Patolojik inceleme amaçlı uygun kaplarda saklandı.

3.2.2.Grup 2: Oral Zn sülfat verilen grup (n:8)

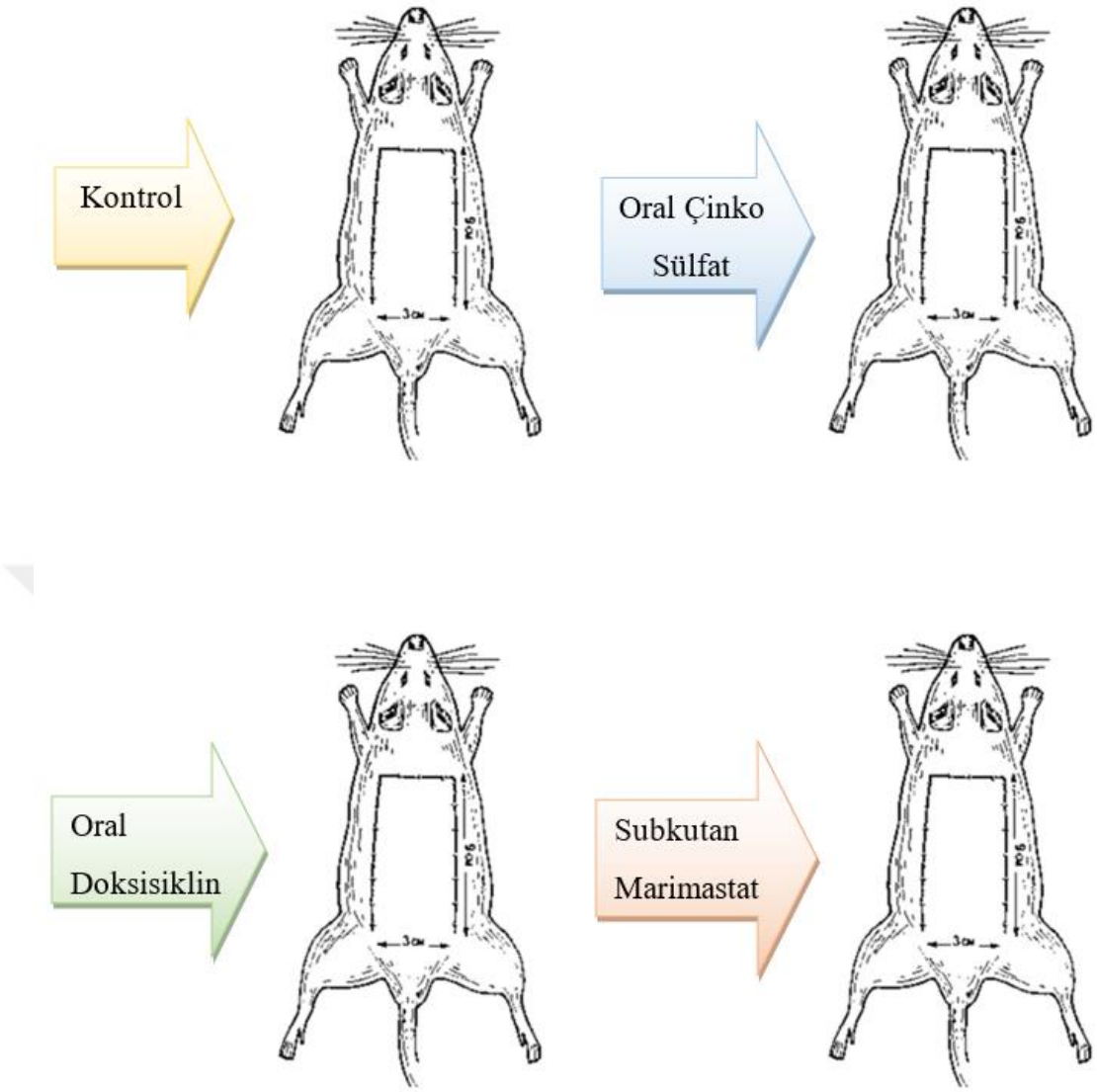
Bu grupta 3×9 cm ebatlarında flep eleve edilip tekrar yerine 3.0 ipek sütür ile sütüre edildi. Ratlara günlük olarak 30mg/kg/gün dozunda oral çinko sülfat verildi. Günlük povidon iyot ile açık pansuman yapıldı. Postoperatif analjezi için 2 gün boyunca parasetamol enjeksiyonları yapılacaktır. Yedinci gün sonunda fleplerin fotoğrafları çekildi, İndosiyanin yeşili verilerek SPY cihazı ile kan dolaşımı bakıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi. Histolojik inceleme için uygun örnekler alınarak uygun kaplarda saklandı.

3.2.3.Grup 3: Oral doksisiklin verilen grup (n:8)

Bu grupta 3×9 cm ebatlarında flep eleve edilip tekrar yerine 3.0 ipek sütür ile sütüre edildi. Ratlara günlük olarak 30mg/kg/gün dozunda doksisiklin verildi. Günlük povidon iyot ile açık pansuman yapıldı. Postoperatif analjezi için 2 gün boyunca parasetamol enjeksiyonları yapılacaktır. Yedinci gün sonunda fleplerin fotoğrafları çekildi, İndosiyanin yeşili verilerek SPY cihazı ile kan dolaşımı bakıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi Histolojik inceleme için uygun örnekler alınarak uygun kaplarda saklandı.

3.2.4.Grup 4: Subkutan Marimastat verilen grup (n:8)

Bu grupta 3×9 cm ebatlarında flep eleve edilip tekrar yerine 3.0 ipek sütür ile sütüre edildi. Ratlara günlük olarak 6,25 mg/kg/gün dozunda subkutan marimastat verildi. Günlük povidon iyot ile açık pansuman yapıldı. Postoperatif analjezi için 2 gün boyunca parasetamol enjeksiyonları yapıldı. Yedinci gün sonunda fleplerin fotoğrafları çekildi, İndosiyanin yeşili verilerek SPY cihazı ile kan dolaşımı bakıldıktan sonra ratlar sakrifiye edildi. Histolojik inceleme için uygun örnekler alınarak uygun kaplarda saklandı.



Şekil 15: Deney gruplarının şematik gösterilmesi

Tablo 2: Çalışmada kullanılan anestezik ve indosiyanin yeşili

Ajanın Adı	Doz	Veriliş Yolu
Ketamin Hidroklorür (Ketalar)	60 mg/kg (anestezi için)	İntraperitoneal
Ksilazin Hidroklorür (Rompun)	8 mg/kg (anestezi için)	İntraperitoneal
İndosiyanin yeşil (ICG, Verdye, 25 mg)	2,5 mg/kg	İntravenöz
Pentobarbital	100 mg/kg	İntraperitoneal

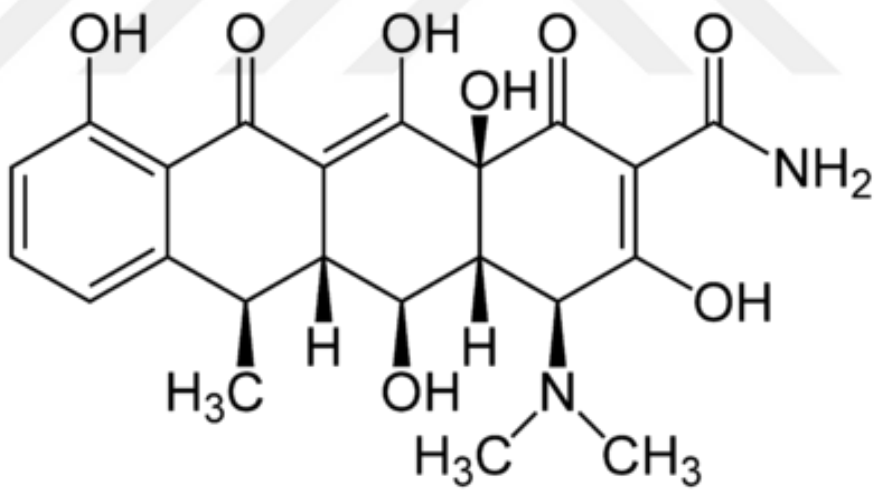
3.3.Anestezi

Deneklerin anestezisi 60 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer, ABD) ve 10mg/kg ksilazin (Rompun, Bayer, Almanya) intraperitoneal olarak uygulanarak anestezisi sağlandı. Anestezi derinliği rat çene ve iskelet kas tonusu değerlendirilerek izlendi. Gerektiğinde uygulanan dozun 1/3'ü kas içi olarak tekrarlanmıştır.

3.4.Çalışmada Kullanılan Medikal Ajanlar

3.4.1.Doksisiklin

Bakteriostatik etki gösterirler. Bu grup antibiyotiklerin ilk üyesi 1948 yılında Streptomices aerofacians isimli bakteriden izole edilmiş olan klortetrasiklin olup Benjamin Duggar tarafından tanımlanmıştır. Bakteri ribozomlarında ribozomal 30s ve 50s alt ünitelerine bağlanarak peptid zinciri oluşumunu engellerler. Ortalama absorbsiyonları %60 ila %70 kadardır. Doksisiklinin aynı zamanda nonspesifik MMP inhibitörü olduğu gösterilmiştir.[78,79]



Şekil 16: Doksisiklin molekülü kimyasal formülü

Tetrasiklinlerin bağ dokusunda yıkımı azaltıcı etkileri çeşitli mekanizmalar ile olur:

1) Hücre dışı mekanizmalar

a) Tetrasiklinler kalsiyum ve çinkoya bağlanarak aktif MMP'lerin direkt inhibisyonunu sağlar

b) Pro-metalloproteinazların oksidatif aktivasyonun inhibisyonunu sebep olur.

c) MMP'lerin inhibisyonu a-1 proteinaz inhibitörü koruyarak dolaylı olarak serin proteinaz aktivitesini azaltır bağ doku yıkımı azalır

2) Hücresel mekanizmalara aracılık eder

a) Sitokinler, indüklenebilir nitrik oksit sentetaz, fosfolipaz a2 ve prostoglandin sentezlerini azaltıcı etki eder

b) Protein kinaz C ve calmodulin üzerinde etki eder

3) Proanabolik etki gösterir

a) Kollajen yapımını artırma yönünde etki gösterir.

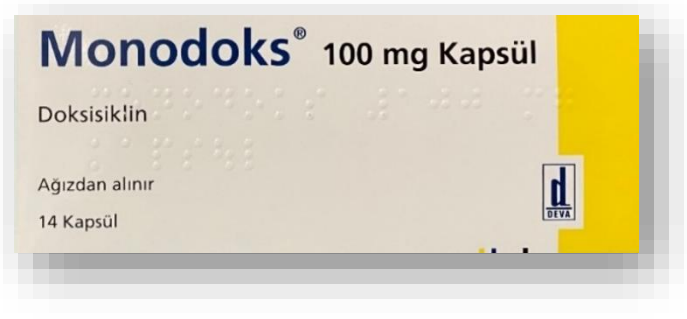
b) Osteoblast aktivasyonunu artırarak kemik oluşumunu arttırır

3.4.1.1.Farmokokinetik

Tetrasiklinler oral veya paranteral kullanılabilirler. Sindirim kanalından başlıca mide ve ince bağırsaklardan emilirler doksisiklin ve minosiklinin emilim oranı %90-%100 arasında iken diğer tetrasiklin türevleri %60- %70 oranında emilirler. Değişen oranlarda idrar, safra ve dışkıyla atılırlar. Doksisiklin böbrek yetmezliğinde doz ayarlanması gerektirmez. Böbreklerden elimine olurlar.[79] Minosiklin göz yaşı ve tükrükte yüksek oranda yoğunlaşır.

3.4.1.2.Yan Etkileri

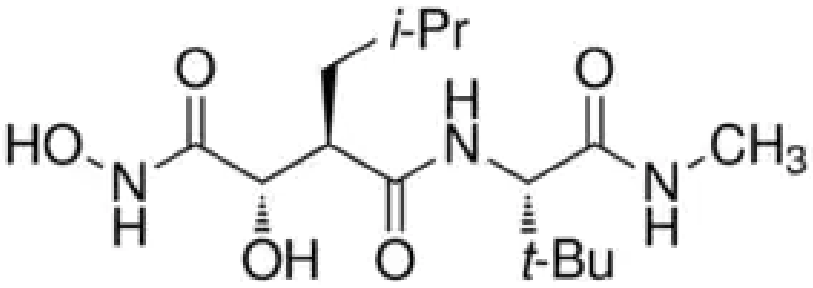
- Dişlerde kalsiyum şelatı oluşturmasına bağlı olarak diskolorasyon
- Fotosensitivizasyon
- Diyare
- Tromboflebit (iv kullanıma bağlı olarak)
- Ağızda kötü tat
- Fanconi tip sendrom (üremi tablosu)
- Psödotumorserebri



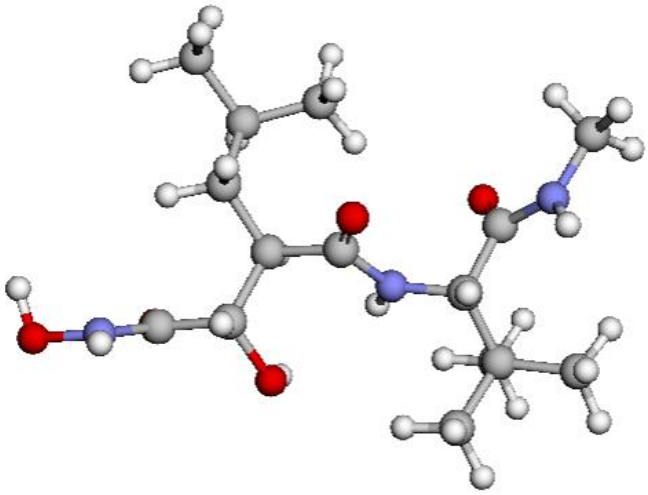
Şekil 17: Doksisiklin (Monodoks, DEVA)

3.4.2.Marimastat

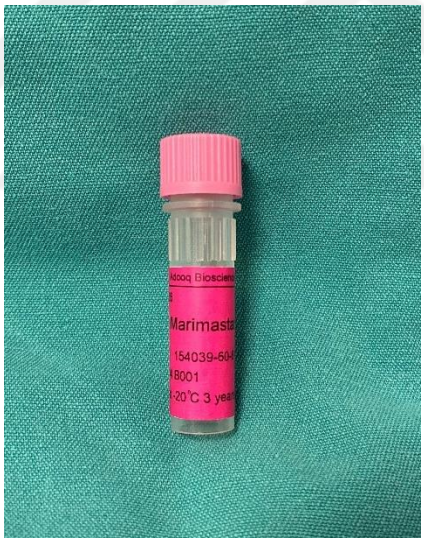
Marimastat hidroksamat tipi bir geniş bir matriks metalloproteinaz inhibitörüdür. MMP enzimlerinin Zn++ moleküllerine kovalent bağlanarak enzim aktivitesini inhibe ederek tümör büyümesini, invazyonu ve metastazı inhibe eder. Doğal MMP substratlarının peptit yapısını taklit eder ve matriks metalloproteninazlarına bağlanır, böylece bazal membranın bu proteazlar tarafından bozulmasını önler. Kanser tedavisinde antimetastatik olarak kullanılır. Bu ajan ayrıca, artrit ve sepsis gelişiminde olduğu kadar bazı malignitelerde de rol oynayabilen tümör nekroz faktör alfa (TNF-alfa) üretiminde rol oynayan bir enzim olan tümör nekroz faktör-alfa dönüştürücü enzimi (TACE) inhibe edebilir. Marimastat, güçlü, geniş spektrumlu bir matris metalloproteinaz (MMP) inhibitörüdür. Kaslarda ve eklemlerde ağrı ve hassasiyetten oluşan kas-iskelet semptomları en yaygın toksisitedir.[80]



Şekil 18: Marimastat molekülü kimyasal formülü



Şekil 19: Marimastat molekülü 3D formülü



Şekil 20: Marimastat (Marimastat, Adooq Bioscience)

3.4.3.Çinko Sülfat

Çinko, karbonik anhidraz, karboksipeptidaz A, alkol dehidrogenaz, alkalin fosfataz, RNA polimeraz, matriks metalloproteinaz gibi 200’ den fazla metalloenzimin fonksiyonlarını gerçekleştirebilmeleri için gereklidir. Çinko vücutta esas olarak DNA, RNA ve protein stabilizasyonunda gereklidir. Nükleik asitler, proteinler ve hücre membranlarının yapımı ve aynı zamanda hücre büyüme ve bölünmesi, seksüel

olgunlaşma ve üreme, yara iyileşmesi, vücut bağışıklığı, karanlığa adaptasyon ve gece görme, tat ve koku duyularının tam olması gibi fizyolojik fonksiyonların gerçekleşmesi için çinkoya ihtiyaç vardır.

Çinkonun biyokimyasal fonksiyonları en çok çinko eksikliğinde gözle görülür hale gelmektedir. Eksiklikten en çok hızlı gelişen dokular (yara granülasyonlarındaki bağ dokusu, sperm, embriyo, fetal hücreler) etkilenir.

3.4.3.1.Farmakodinamik:

Emilim: Çinko oral yolla alındığında ince barsaklardan (%60'ı duodenumdan, %30'u ileumdan, %10'u jejenumdan) spesifik bir mekanizmayla absorbe edilir. Mukoza hücrelerinde çinko bağlayıcı proteinler tarafından demir gibi tecrit edilir ve daha sonra mukoza hücresi zarından kandaki serum albuminine iletilir. Diyetle alınan çinko intraluminal ileti ile enterositi geçerek plazmaya verilir.

Dağılım: Albumine %84'ü, alfa2-makroglobuline %15'i ve amino asitlere %1'i bağlı olarak taşınır. Plazmadaki yarı ömrü 3 saat olarak ölçülmüştür. Kandaki çinkonun %80'i eritrositlerdeki karbonik anhidraz enzimi içerisinde, %3'ü lökositlerde ve az miktarda da trombositler içerisindedir. Diyetle alım, hormonlar (glukokortikoidler, glukagon, epinefrin), stres, inflamatuar hastalıklar plazma çinko düzeyini etkilemektedir. Eksikliğinde dokulardaki kayıp aynı değildir, saç, deri, kalp ve iskelet kasında aynı kalırken, plazma, karaciğer, kemik ve testiste çinko düzeyi azalır.

Biyotransformasyon: Biyotransformasyona uğramaz.

Eliminasyon: Daha çok gastrointestinal sistemden atılmakla birlikte böbrekten de bir miktar eliminasyona uğrar.



Şekil 21: Çinko Sülfat (Zinco, BERKO)

3.5.Hayvan Modeli

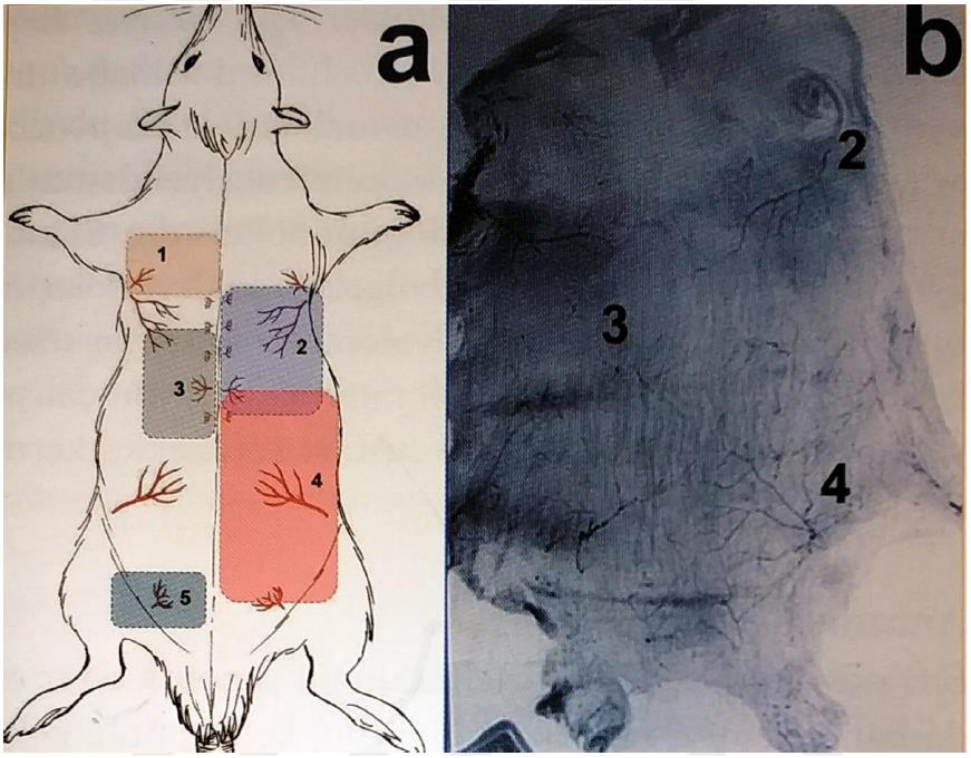
Deri anatomisi insana göre farklı olmasına rağmen flep yaşayabilirliğini değerlendirme açısından en basit organizma olması nedeniyle rat, deri flebi araştırmalarında en sık tercih edilen denek olmuştur.[81] Rat derisi ile insan derisi arasındaki en önemli fark ratta bulunan pannikülüs karnosus adı verilen kas yapısında olan ve derin kas fasyasına gevşek olarak dermise sıkıca bağlanan tabakadır. İnsanda ise benzer olarak pannikulus adiposus tabakası bulunmaktadır. Derin fasya ile ilişkilidir. İnsan ve rat deri yapısı farklı olmasına rağmen pannikülüs tabakasının flebe dahil edilmesi flep kanlanmasını artırır. Sıçan sırtından tanımlanan flep modeli, ilk Robert McFarlane ve ark. tarafından 1965 yılında tanımlanan kranial bazlı sırt yarımada flebidir.[82] Bu flep geciktirme kavramını araştırmak amacıyla geliştirilmiş olmasına rağmen "random " dolaşım paternine sahip olması nedenli sonraki yıllarda flep çalışmalarına kullanılmıştır. Ian Taylor ve Toshiharu Minable'nin 1992yılında yayınlamış oldukları anatomik çalışmalarda memelilerdeki "Anjiyozom"ların tanımlanması ve sıçan sırt bölgesi damarlanmasını da tanımlaması sayesinde flep araştırmalarında önemli bir adım olmuştur.[81,83,84] Syed ve ark. ise sıçan göğüs ve sırt bölgesinde, lateral torasik ve iliolomber damarlar tarafından beslenen iki ayrı flep tanımlamışlardır.[81]

3.5.1.Anatomi

Sıçan sırt derisinin dolaşımı orta hattın her iki yanında kranial kısımda aksiller arterden dallanan lateral torasik arterler, kaudal kısımda aorttan çıkan iliolomber arterler iliak dalları ve ortada kalan kısımlarda ise 4.-12. İnterkostal arterlerin dorsal

dallarından beslenir.[81] İnterkostal arterlerden bir tanesi daha geniş olup sırt dolaşımı için önem arz eder. Ayrıca skapula üzerinde ve gluteal kas bölgesinde iki küçük damar sistemi de sırt dolaşımına katılır. Skapula üzerinden enseye kadar olan kısmın dolaşımını sirkumfleks-skapuler arter trunkusundan çıkan arterler ile gluteal bölgede bahsedilen alan dışındaki kalan kısım ise femoral arterden gelen biseps femoris kas perforatörü ile beslenir. [81] Lateral torasik arter sırt derisinin yukarı yarısını beslerken toraks alt kısmını ise bahsedilen interkostalin geniş olan dalı besler.

Sırt derisinin kaudal kısmının beslenmesinden sorumlu olan iliolomber arter ise aortadan renal arterin hemen aşağısından çıkıp laterale doğru ileler, psoas kası lateralinde iliak ve lomber dallarına ayrılırlar. Lomber dal karın arka duvarını beslerken, iliak arter ise laterale ve arkaya doğru ilerler ve inguinal ligaman lateralinden arkaya döner. Pannikülus karnosus altında anterior ve posterior dallarına ayrılarak sırt dolaşımına katılır. [81]



Şekil 22: Sırt derisi dolaşım a) Sırt dolaşımının 5 temel arteri : 1. Sirkumfleks-skapuler trunkusun dalları, 2. Lateral torasik arter 3. Posterior interkostal arterlerden geniş olan 4. İliolomber arterin iliak dalı 5. Kaudal femoral arterden gelen biseps femoris kas perforanı b) Sıçan dorsal cildini kanlandıran damar sistemleri mikroanjiyografik görünümü 2. Lateral torasik arter 3. Posterior interkostal arter 4. İliolomber arter [81]

3.5.2.Sıçan Dorsal Yarımada Flepleri

Sıçan sırtında flep modelini ilk Robert McFarlane ve ark. tanımlamıştır. Flep modellerinde standart bir nekroz alanının bulunması önemlidir. Flep dolaşımına etki eden durumların araştırılması için flepte bulunan canlı ve nekroz alanlarının dışında dolaşımı sınırda olan alanlar bu amaca hizmet eder. Kolay hazırlanması ve distal kısımda nekroz olması sebebiyle sıkça tercih edilmiştir.

McFarlane flebi; her ki skapula ve posterior iliak çıkıntılar işaretlenip, flep bu noktalar arasında planlanmıştır. McFarlane flebi kranial bazlı olarak planlamıştır. Flep en-boy ölçümü yerine anatomik noktalara göre flep planlanmakta bu da hayvan büyüklüğüne göre flep boyutunu değiştirmektedir.[82] Burada flep hayvan ve flep boyutlarında bağımsız hep aynı damarlardan beslenmesine rağmen flep nekroz oranları %22 ile %50 arasında değişen büyüklüklerde gözlenmiştir.[82] Bu nedenle sonraki çalışmalarda McFarlane flebi değiştirilerek tutarlı bir nekroz oranı oluşturmayı planlamıştır.

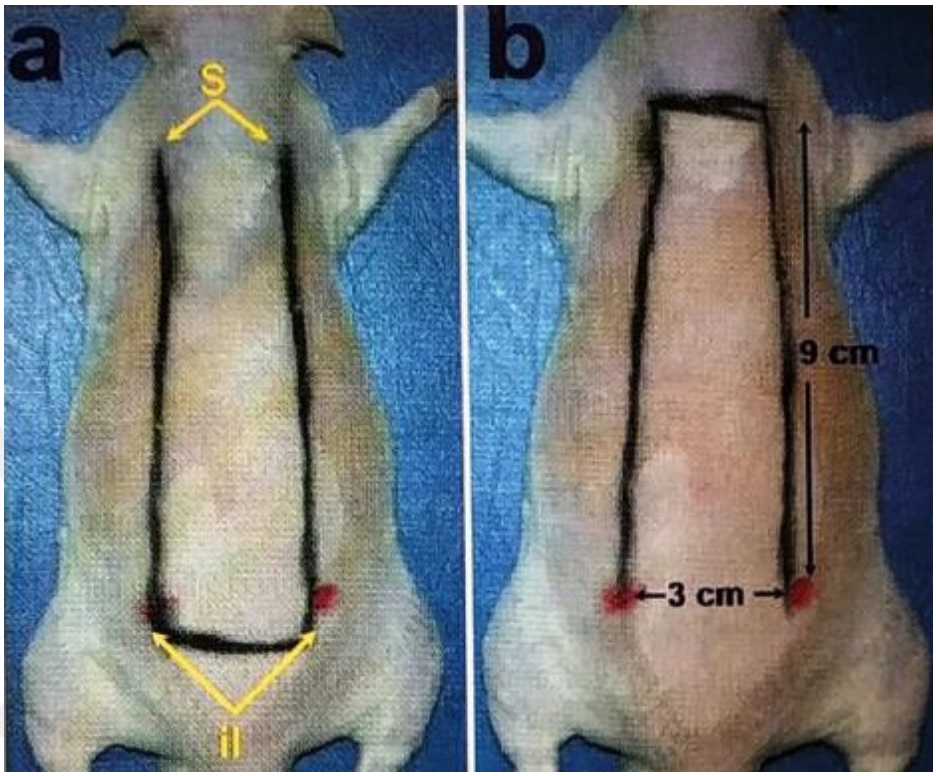
Adamson ve ark. ise 1:3 en-boy oranı ile kaudal bazlı flep, Korlof ve ark. ise flep altına teflon tabak yerleştirerek tabandan beslenmesini engelleyerek flep planlamıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda ise flep uzunluğunun 9 cm ve üzeri olanlarda tabandan beslenmenin sonucu etkilemediği ortaya konulmuş ve bu yöntem terk edilmiştir.

Roger Khouri ve ark.nın yaptığı çalışmalarda ise en tutarlı flep nekroz oranlarının eni 3 cm boyu 9 cm olan kaudal bazlı fleplerde olduğu ortaya çıkmıştır. Bu modifikasyonlarla daha az sayıda hayvanla istatiksel olarak anlamlı sonuçlar alınabildiği düşünülmektedir.[81]

Sırt yarımada fleplerini eleve edilirken deri altında bulunan pannikulus karnosus kası da flebe dahil edilerek insizyon derin kas fasyasına kadar yapılır ve kas üzerindeki gevşek ve kısmen avasküler planda diseksiyona devam edilerek flep eleve edilir. Flebin kranial veya kaudalden planlanmasına göre flebe gelen diğer dallar kesilir. Flep eleve edilmesi ve hemostaz sonrası aynı yere sütüre edilir.

Deri flebi çalışmalarında sonucu etkilemesi muhtemel birkaç faktöre dikkat edilmelidir. Oda sıcaklığı derinin epidermal yenilenme zamanına uygun tutulmalı ve aynı zamanda oda sıcaklığının düştüğü durumlarda flep damarlarında vazospazma neden olabileceği ve bunun da flep distalinde meydana gelen iskemiyi daha da kötüleştirebileceği unutulmamalıdır. Flep dolaşımı ile ilgili bir diğer değişken ise östrojenin flep dolaşımı,

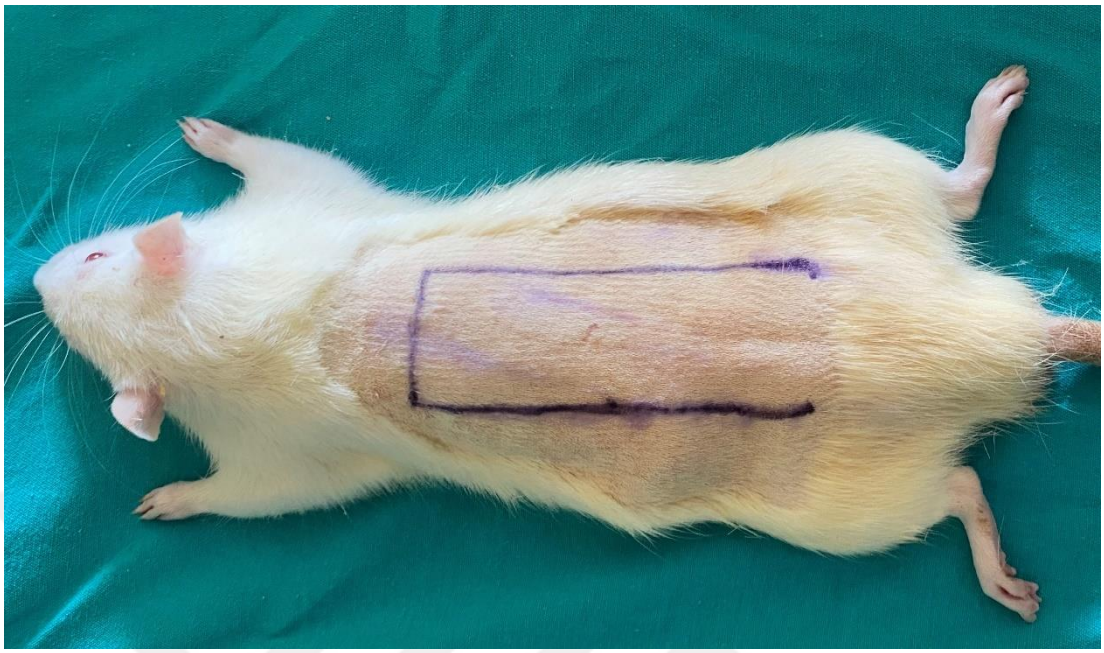
nekrozu ve flep kontraksiyonunu etkilemesi nedenli dişi cinsiyetin sonuçların güvenilirliğini etkilemesidir.[81]



Şekil 23 Sırt yarımada flepleri a) Kranial bazlı random dolaşım paternli McFarlane flebi S: Her iki skapula ve İl: her iki iliak çıkıntı b) Kaudal tabanlı yarımada flebi[81]

3.6.Cerrahi

Cerrahi işlemleri hepsi aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi. Dorsal cilt derisi elektrikli tıraş makinası ile tıraş edilip betadine ile cerrahi alan temizliği yapıldı. Tüm cerrahi işlemler boyunca sterilizasyona dikkat edilerek dorsal ciltten Roger Khouri'nin modifiye ettiği McFarlane'nin tanımladığı flep 9x3 cm ebatlarında kaudal tabanlı olacak şekilde tasarlandı. Flep tüm deri katmanları ve panniculus karnosusu da içerecek şekilde derin kas fasyası üzerinden kaldırıldı. Kanama kontrolü yapılmasının ardından 3.0 ipek sütür ile flep yerine tekrar sütüre edildi.



Şekil 24: Kaudal tabanlı 3x9 cm ebatlarında McFarlane flebinin planlanması



Şekil 25: Kaudal bazlı McFarlane flebinin cilt insizyonlarının tamamlanması



Şekil 26: Flebin kaldırılışı ve flebin alt yüzünün makroskobik görünümü



Şekil 27: Flebin kaldırıldığı zemine sütürler ile sütüre edilmesi

3.7.Postoperatif Bakım

Tüm ratlar ayrı kafeslere yerleştirilerek tedavi gruplarına göre kafes üzerine etiketler yerleştirildi. Postoperatif analjezik olarak içme suyuna parasetamol ilave edilerek analjezi sağlandı. Postoperatif 3 gün boyunca betadine ile pansuman yapıldı. Deney hayvanları internasyonel hayvan deney bakım ve deney kılavuzlarına göre standart laboratuvar koşulları olan sıcaklık 23 ±2 °C, 12 saat gündüz/gece siklusu olan kafeslere alınmış olup ratlar, Dokuz Eylül Üniversitesi Deney Hayvanları Laboratuvarında standart koşullarda beslenerek takip edildi.

3.8.Enjeksiyonlar

1. Gruptaki ratlara ek işlem yapılmadı.
2. Gruptaki ratlara ilk dozu cerrahi işlemden 1 saat önce olmak üzere toplam 7 gün boyunca 30mg/kg/gün dozunda gavaj ile oral çinko sülfat (Zinco, Berko) verildi.
3. Gruptaki ratlara ilk dozu cerrahi işlemden 1 saat önce olmak üzere toplam 7 gün boyunca 30mg/kg/gün dozunda gavaj ile doksisiklin (Monodoks, Deva) verildi.
4. Gruptaki ratlara ilk dozu cerrahi işlemden 1 saat önce olmak üzere toplam 7 gün boyunca 6,25mg/kg/gün dozunda intraperitoneal DMSO ile sulandırılmış marimastat (Adooq bioscience, katalog no: A12826) verildi.

3.9.Sakrifikasyon

Postoperatif 7. günde ratlara ketamin ve ksilazin ile anestezi uygulandıktan sonra 2,5 mg/kg ICG kuyruk veninden verildikten sonra 3-4 dakika boyunca SPY Elite cihazı ile McFarlane flebi doku kanlanması ölçüldü. Sonrasında tripod yardımıyla aynı yükseklikten olmak üzere nekroz alan hesabı için dijital fotoğraflar çekildi ve sonrasında flepten histopatolojik inceleme için örnekler alınarak formalin solüsyonu içerisinde muhafaza edildi. Ratlar 100mg/kg pentotal ile sakrifiye edildi.

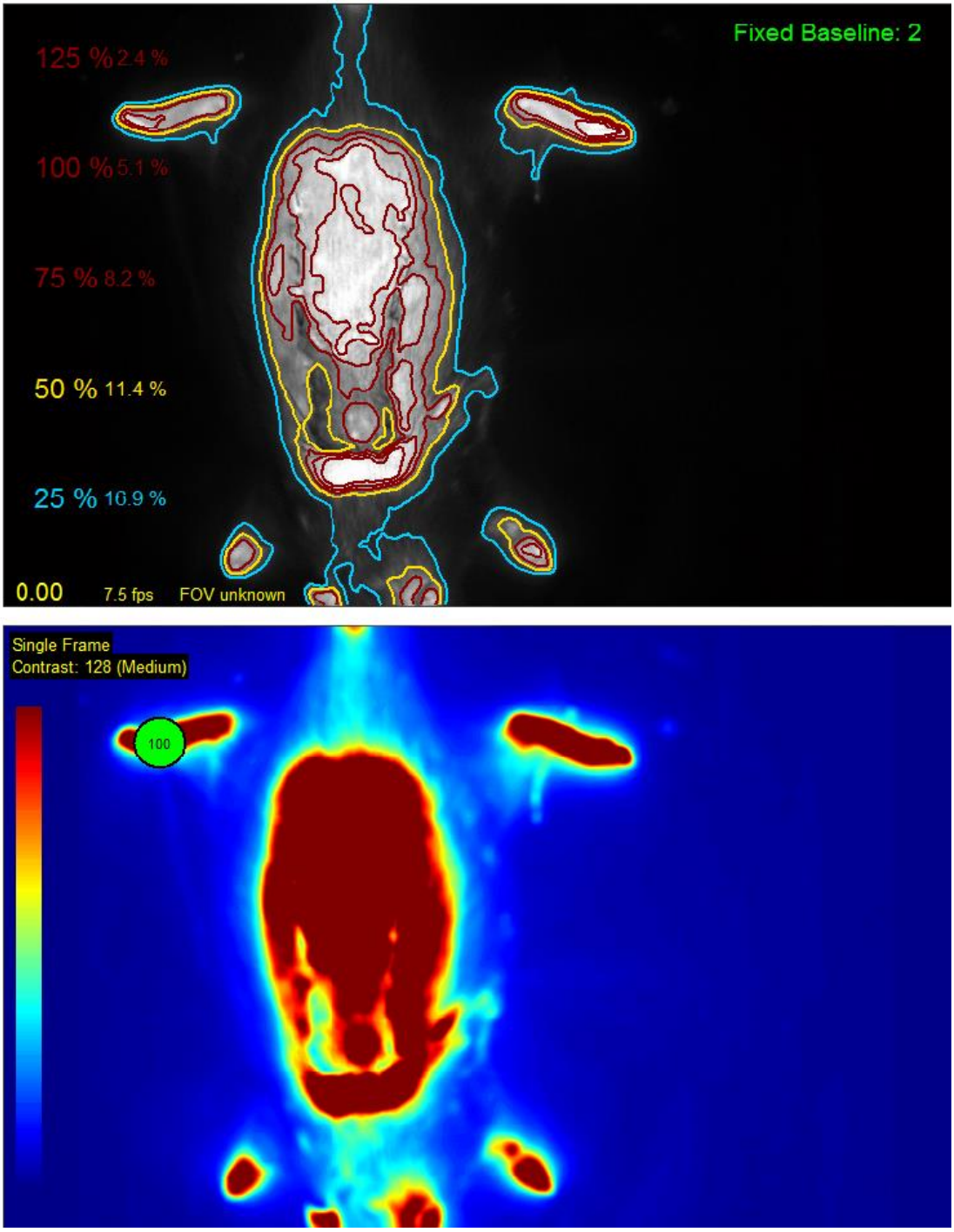
3.10.İCG ile Kızılötesi Aracılı Anjiografi Çekimi

Postoperatif 7. Günde ratlara intraperitoneal 60mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin verildikten sonra yeterli anestezi sağlanması sonrası prone pozisyonda rat kuyruk veni 24G intraket ile kanalize edildi. Cihazın kamerası ölçüm yapılan flebe 90°

açı ile dik ve 30 cm uzaklıktan ölçüm alacak şekilde ayarlandıktan sonra 2,5 mg/kg indosiyanin yeşili (ICG, Verdye, Almanya) bolus olarak enjekte edildikten sonra flep üzerinde 3 dakika boyunca LifeCell SPY-Elite floresan anjiografi cihazı kullanılarak İCG ile kızılötesi çekim alınmıştır.[85,86] Rat arka ayaklarının dolaşımı referans alınarak Spy-Q Analysis Toolkit (2016 Novadaq Technologies Inc, Canada) programı ile bu kaydedilen görüntü işlendi ve üst katman analizi yapıldı. Üst katman algoritması olarak ortalama seçilerek relatif kantifikasyon modu kullanıldı. Görüntüler Adobe Photoshop CC 2017 programında analiz edilerek flep ortalama kanlanma miktarı relatif perfüzyon ünite (RPU) olarak hesaplanıp % olarak kaydedildi.



Şekil 28: Kliniğimizde yer alan SPY Elite System Görüntüleme Cihazı

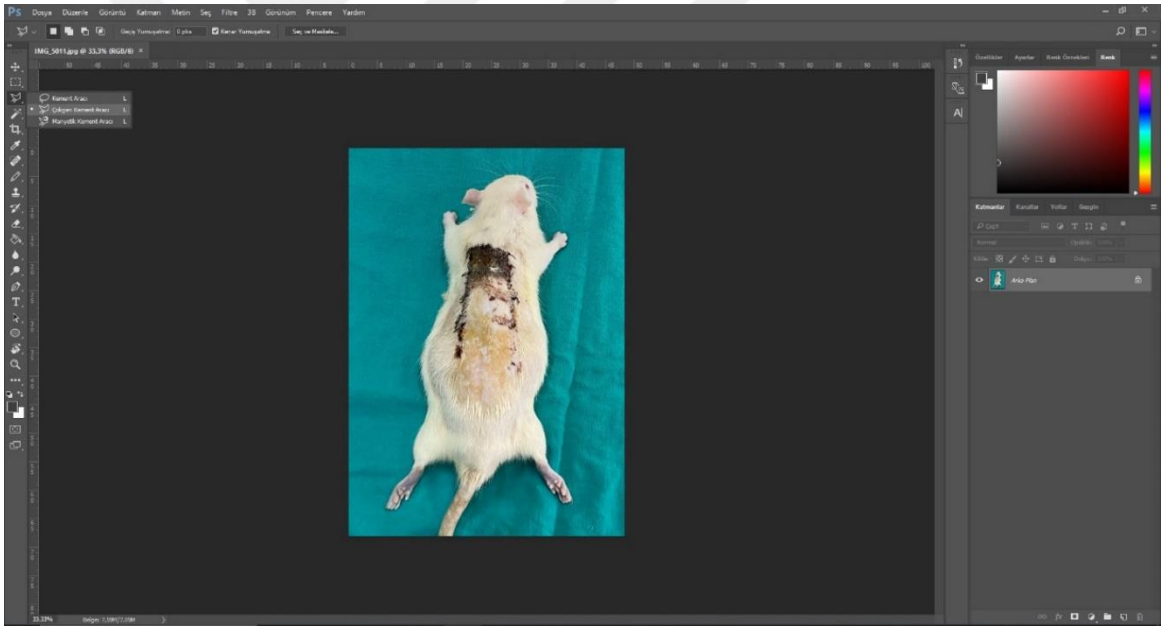


Şekil 29: SPY Elite System ve SPY-Q Analysis Toolkit ile yapılan analiz

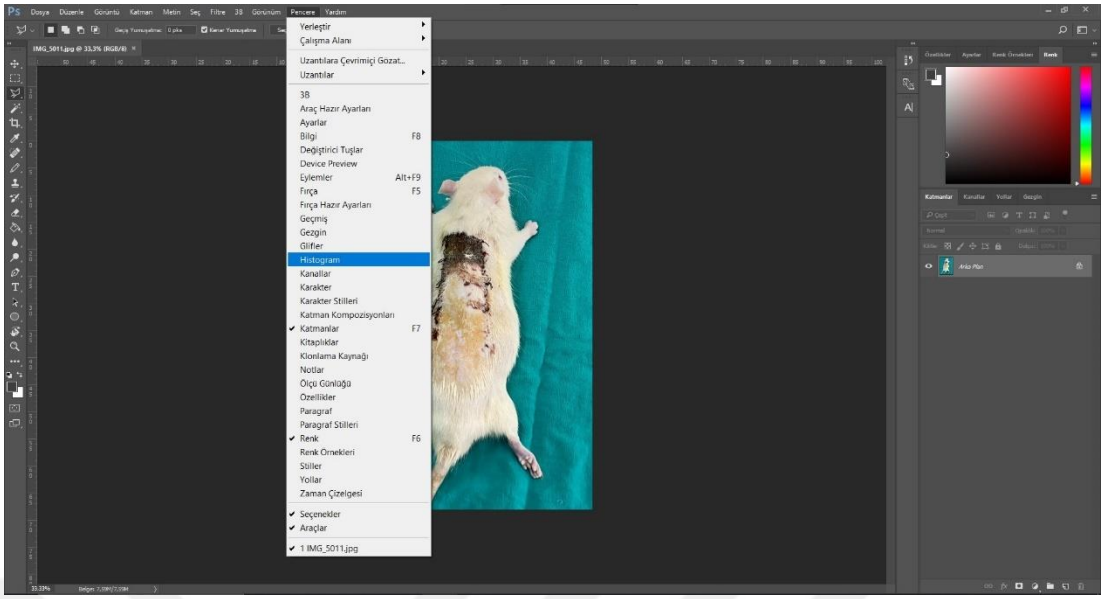
3.11.Yüzey Alan Ölçümü

McFarlane flebi elevasyonundan 7 gün sonra tüm ratlar İCG ile ölçüm sonrası prone pozisyona alınarak sabit ışık altında ve sabit mesafeden fotoğraflama yapılmıştır Çekilen tüm fotoğraflarda canlı ve nekrotik alanların hesaplanması Adobe Photoshop CC 2017 programı kullanılarak hesaplanmıştır. Fotoğrafların programa yüklenmesinin ardından çokgen kement aracı seçilerek flep nekroz alanı ve flep tüm alanı seçildi. Ardından histogram aracı ile seçilen alanların piksel değerleri görüntülendi. Elde edilen piksel değerleri ile nekrotik alan pikselinin tüm alan pikseline bölünmesinin 100 sayısıyla çarpımı sonucunda nekrotik alan yüzdesi hesaplandı. Elde edilen ölçümlerden nekrotik alan yüzdesi hesaplanmıştır.

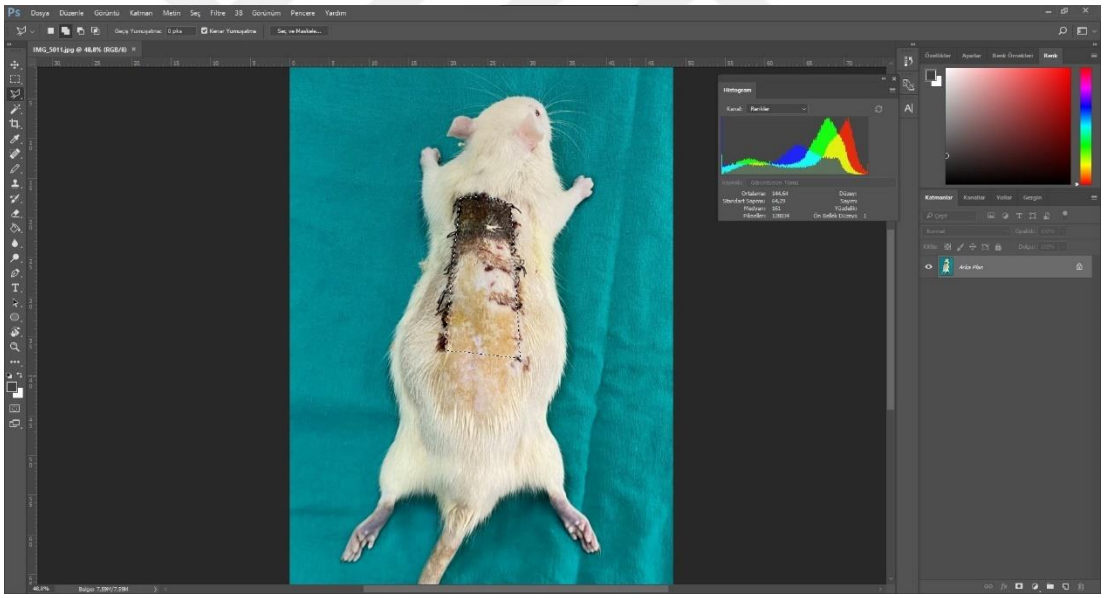
Nekrotik alan yüzdesi = (nekrotik alan pikseli / tüm alan pikseli) x100



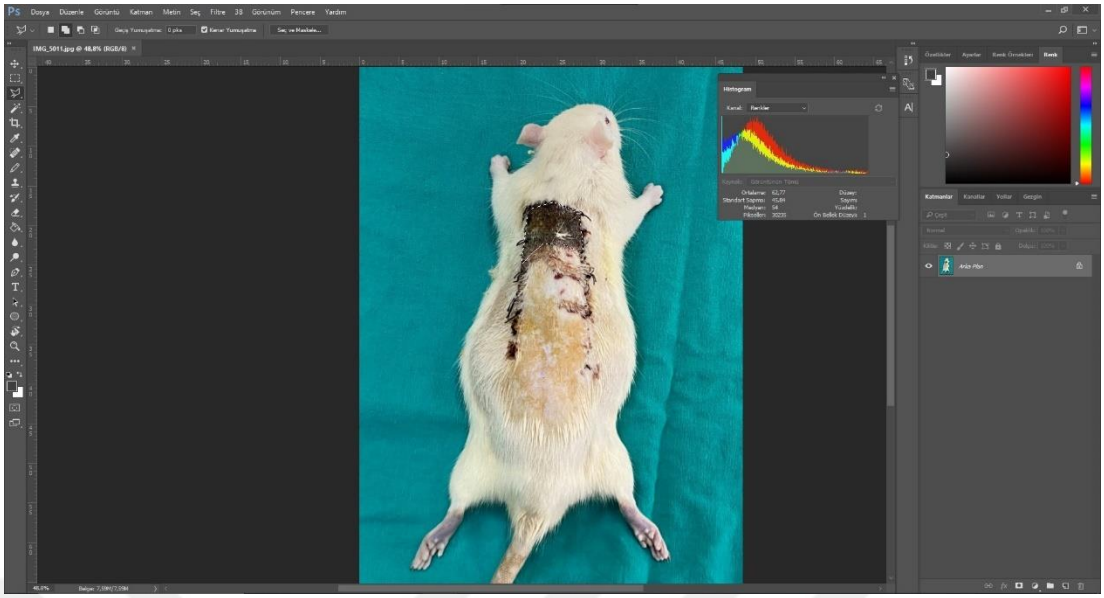
Şekil 30: Fotoğrafın Adobe Photoshop programına yüklenmesi ve çokgen kement aracı seçilmesi



Şekil 31: Alan seçimi yapıldıktan sonra histogram seçilerek seçilen alanın piksel değerinin görüntülenmesi



Şekil 32: Tüm flep alanın histogram aracı ile piksel değerinin hesaplanması



Şekil 33: Flep nekroz alanının histogram aracı ile piksel değerinin hesaplanması

3.12.Histopatolojik İnceleme İçin Örneklerin Alınması

Flep cerrahisi sonrası 7. Gün tüm ratlar pentobarbital hidroklorür 200mg/kg intraperitoneal uygulaması ile ötenazi uygulandıktan sonra flebin orta 1 cm'lik kısmından tüm flep boyunca yaklaşık 5mmx9 cm ebatlarında doku örneği alınarak bunlar 3er cm'lik parçalara ayrılmıştır. Flep proksimal, orta ve distal kısmı olacak şekilde etiketlenmiştir. Bu örneklerin bulunduğu kaplara %10'luk formalin solüsyonu koyularak preparatlar histopatoloji laboratuvarına teslim edilmiştir.

3.13.Doku Takibi

Sakrifikasyon sonrası alınan deri örnekleri histolojik incelemeler için %10'luk formaldehit solüsyonunda 48 saat fikse edildi. Fikse edilen dokular bir gece akarsu da bekletilerek fazla fiksatif uzaklaştırıldı. Rutin doku takibindeki tüm işlemler 60°C etüvde gerçekleştirildi. Dehidratasyon amacıyla 20'şer dakika %70'ten %96'ya artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 20'şer dakika dört değişim aseton solüsyonlarından geçirildikten sonra iki değişim 30'ar dakika ksilolde tutuldu. 60˚C'lik etüv içerisinde iki değişim parafin uygulanıp 1'er saat parafin ile

immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü. Rotary mikrotom (RM 2255, Leica) aracılığı ile 5µ kalınlığında kesitler alındı.

3.14.Hematoksilen & Eozin Boyama

Alınan kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60˚C'lik etüvde tutuldu. Ardından ilki etüvde diğer ikisi oda sıcaklığında 20'şer dakikalık üç farklı ksilole tabi tutuldu. Daha sonra rehidratasyon işlemi için 5 değişik azalan alkol serilerinden (absolü- %70) geçirilip, kesitler distile su ile çalkalandıktan sonra 10 dakika Hematoksilen (05- 06002L, Bio-Optica, Milano, İtalya) ile nukleusların boyanması sağlandı. Boyamanın ardından, boyanın fazlasının dokudan uzaklaştırılması için 10 dakika akarsuda yıkanan kesitler, 2 dakika Eozin (05-10003L, Bio-Optica, Milano, İtalya) boyası ile boyandı ve böylece hücre sitoplazmasının boyanması sağlandı. Boyamadan sonra sırasıyla %70, %80, %96 ve 2 seri absolu alkolden geçirilen kesitler şeffaflaştırma amacıyla 20'şer dakika üç değişim ksilolde tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı.

3.15.İmmünohistokimyasal Boyama

İmmünohistokimyasal olarak VEGF ve Active Caspase-3 primer antikorları kullanılmıştır. Alınan kesitler öncelikle 60ºC'lik etüvde 1 gece bekletildi daha sonra şeffaflaştırma amacıyla ilki etüvde diğer ikisi oda ısısında olmak üzere 30'ar dakika üç değişim ksilole tabi tutuldu. Azalan alkol serilerinden geçirilip distile suda çalkalandı. Daha sonra dokular %10'luk Sitrat tamponunda 5 dakika mikrodalgada kaynatıldıktan sonra soğumaya bırakıldı. Soğuyan dokuların etrafı Pappen (Z672548-1EA Sigma Tokyo, Japonya) ile çizildi ve üzerlerine dokuların kurumaması amacı ile PBS koyuldu. Ardından 3 kez PBS ile yıkanan kesitler, 10 dakika oda ısısında H_2O_2 ile bekletilerek dokuda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. Tekrar PBS ile yıkama yapıldı ve 20 dakika bloklama (A) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile bekletildi. Yıkama yapılmadan primer antikor rat spesifik VEGF (1:100, Bioss USA, bs-1313R) / Active Caspase-3 (1:100, Bioss, USA, bs-0081R) ile + 4 ºC' de 1 gece bekletildi. Ertesi gün PBS ile yapılan yıkamadan sonra anti-mouse biotin-streptavidin hidrojen peroksidaz sekonder antikor (B) solüsyonu (İnvitrogen, LOT 1155338A) ile

30 dakika bekletildi. Tekrar yıkama yapıldıktan sonra C solüsyonunda (İnvitrogen, LOT 1155338A) 20 dakika bekletildi. Yine PBS ile yıkanan kesitler oluşturulan immünohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla DAB (Roche, Germany) ile muamele edildi. Distile su ile yıkanan kesitlere Mayer's hematoksilen ile artalan boyaması sağlandıktan sonra akarsu ile yıkandı. Artan alkol ve ksilol serilerinden geçirildikten sonra entellan ile kapatıldı.

3.16.İstatistiksel Analiz

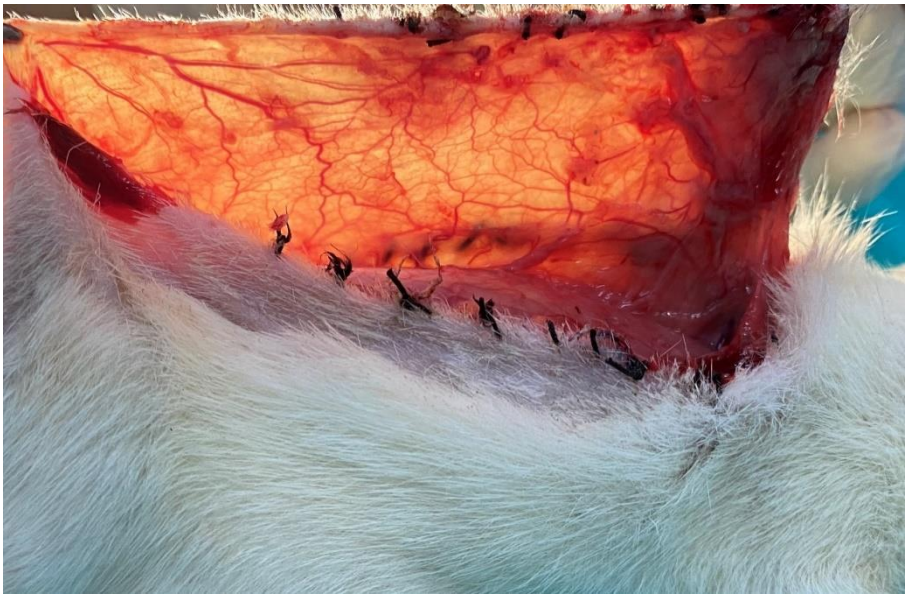
Histolojik verilerin istatistiksel analizi GraphPad Prism 9 istatistik programı kullanılarak yapılmıştır. Değerler ortalama±standart hata olarak verilmiştir. Gruplar arası istatistiksel karşılaştırmada Kruskal Wallis Varyans Analizi testi, grupların ikili karşılaştırmasında da Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p<0,05$ olan değerler istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Nekroz yüzdesi ve SPY ölçümleri ise IBM SPSS 21.0 deneme sürümü paket programı ile yapılmıştır Yapılan çalışmanın istatistiksel analizlerinde; tanımlayıcı istatistikler, sürekli değişkenler için ortalama± Standart Sapma olarak kullanılmıştır. Normallik varsayımı Shapiro-Wilks ve Kolmogorov-Smirnov testler ile sınanmıştır. İkiden fazla grup karşılaştırılmasında tek yönlü varyans analizinden yararlanılarak, post-hoc testlerde Bonferroni yöntemine başvurulmuştur. Tüm analizlerde istatistiksel olarak anlamlılık derecesi (p değeri) 0,05 olarak belirlenmiştir.

4. BULGULAR

Çalışmamız süresince rutin beslenme ve barınma yöntemleri ile bakım yapılırken günlük insizyon hattı takibi ve batikon ile açık pansumanla takip yapıldı. Flep cerrahisi sonrası yapılan takiplerde rat kaybı yaşanmamıştır. Cerrahi alanda enfeksiyon, hematom, seroma ve majör yara dehissansı izlenmemiştir. (Resim) Postoperatif 7. günde tüm fleplerde flep distalinde nekroz izlendi.



Şekil 34: Postoperatif 7. Günde flep nekroz alanı ve insizyonların görünümü



Şekil 35: Postoperatif 7. Günde flebin alttan makroskobik damarlanma artışının gözlenmesi

4.1.Makroskopik Bulgular

Tablo 3: Tanımlayıcı İstatistikler Tablosu

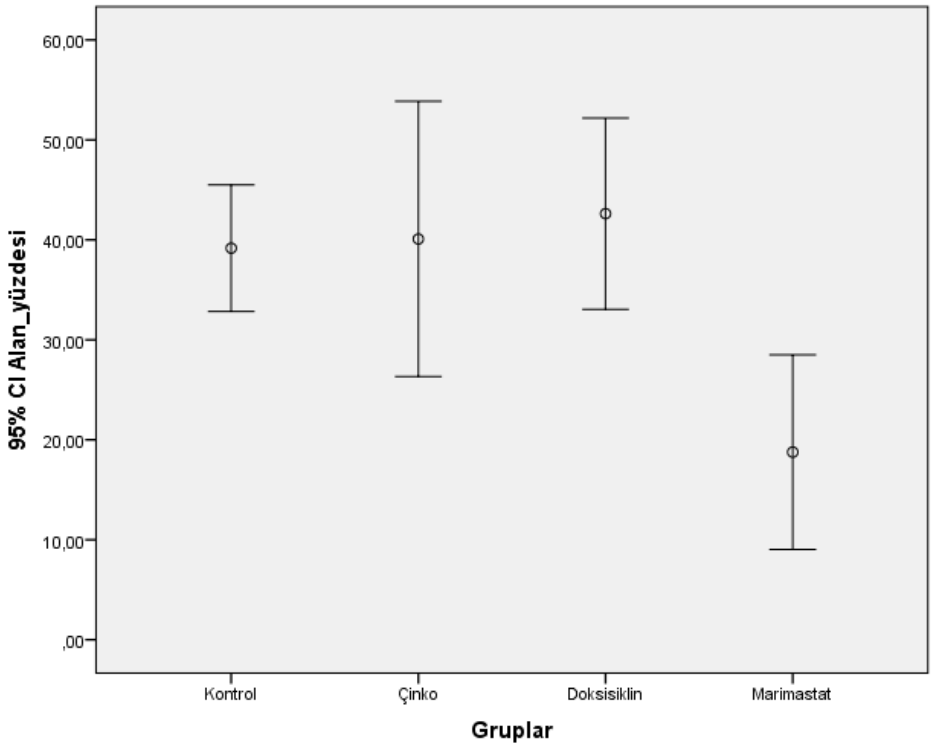
Değişkenler	N	Minimum	Maksimum	Ortalama	Std. Sapma
Spy Sonuçları	32,00	15,45	80,39	53,36	14,04
Nekroz Alan Yüzdesi	32,00	2,39	64,76	35,16	15,12

4.1.1.Flep Nekroz Oranları

Tablo 4: gruplara göre flep nekroz alan yüzdelerinin varyans analiz tablosu

Değişken	Kontrol Ort. ± Std. Sapma	Çinko Ort. ± Std. Sapma	Doksisiklin Ort. ± Std. Sapma	Marimastat Ort. ± Std. Sapma	F Değeri	P Değeri
Nekrotik Alan Yüzdesi	39,17±7,56	40,09±16,46	42,62±11,45	18,77±11,64	6,543	0,002

Nekrotik alan yüzdeleri bakımından gruplar karşılaştırıldığında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark olduğu saptanmıştır. (p=0.002). Marimastat ile kontrol grubu karşılaştırıldığında marimastat grubunda istatiksel olarak anlamlı (p=0.002) oranda nekroz alanı daha azdı. Doksisiklin ile kontrol grubu karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı. Yine çinko ile kontrol grubu karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır. Ancak Marimastat verilen grup ile doksisiklin verilen grup karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. (p=0.002). Marimastat verilen grup ile çinko sülfat verilen grup arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı. (p=0.001).



Grafik 1: Tüm grupların hesaplanan nekroz alan yüzdesi dağılımları

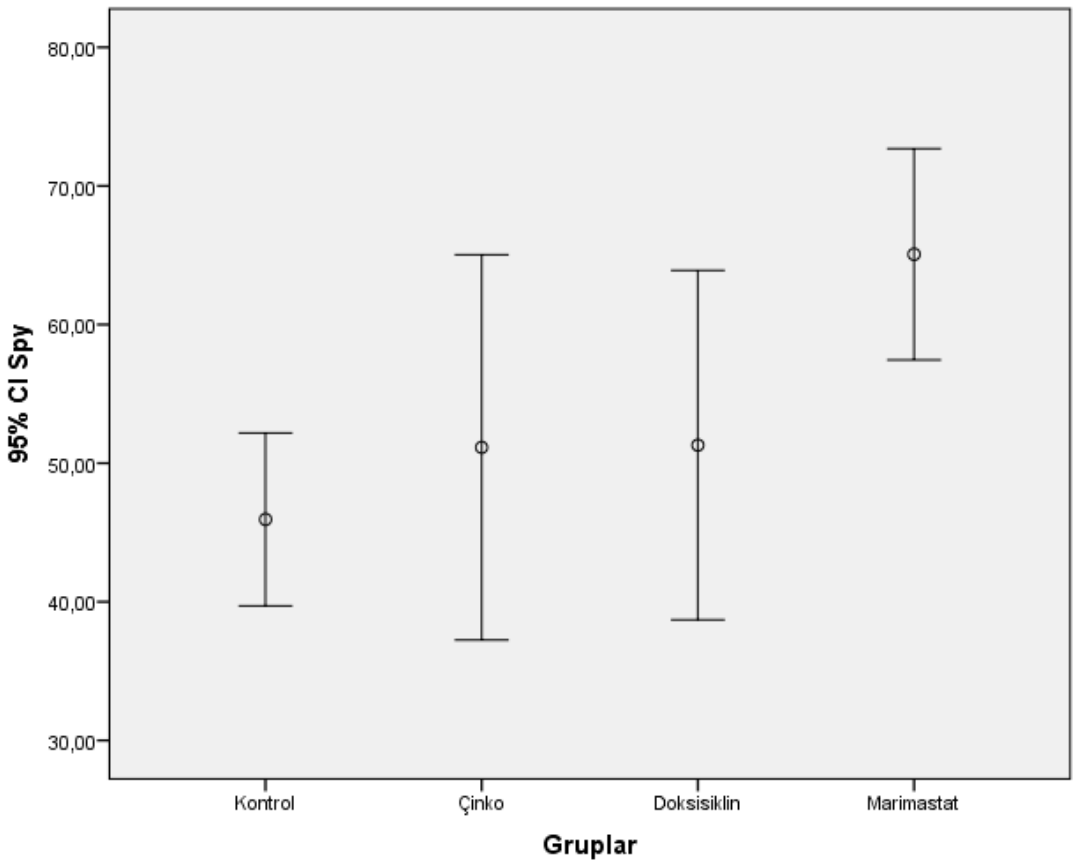
4.1.2.ICG ile Kızılötesi Aracılı Anjiografi

Her bir deneğe postoperatif 7. günde intravenöz bolus indosiyanin yeşili (İCG) verilerek Spy Elite System ile görüntüler alınarak Spy-Q Analysis Toolkit ile yapılan ölçüm sonuçları Adobe Photoshop programında her bir denek flebinin kanlanma miktarı relatif perfüzyon ünite (RPU) olarak ölçülüp yüzde olarak hesaplandı.

Tablo 5: Spy sonuçları için varyans analizi tablosu

Değişken	Kontrol Ort. ± Std. Sapma	Çinko Ort. ± Std. Sapma	Doksisiklin Ort. ± Std. Sapma	Marimastat Ort. ± Std. Sapma	F Değeri	P Değeri
Spy Sonuçları (%)	45,94±7,46	51,14±16,62	51,30±15,07	65,07±9,12	3,343	0,033

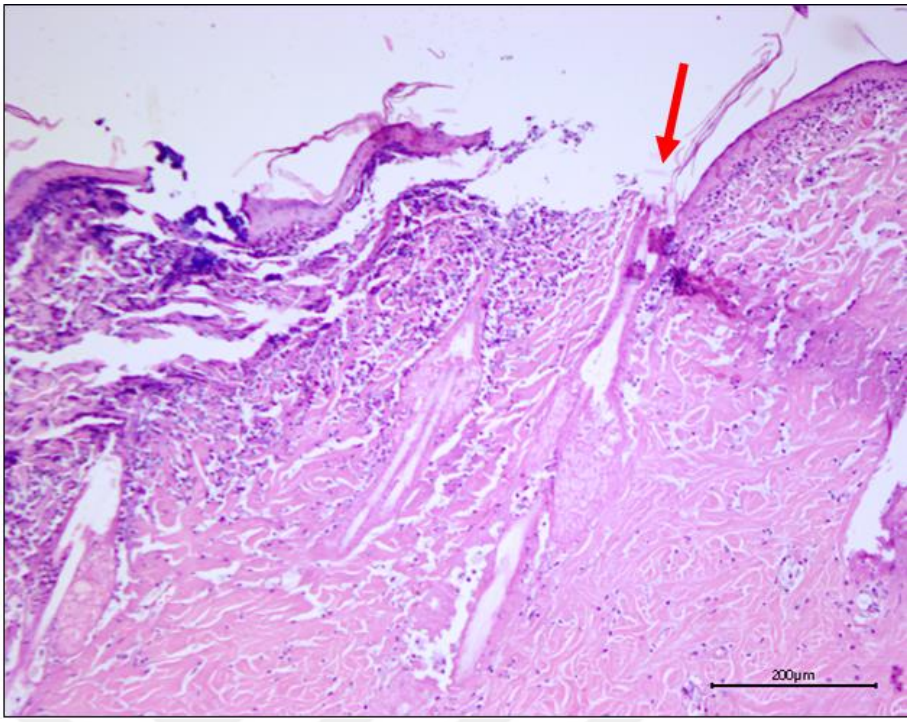
Tüm gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0.033). Marimastat verilen grubun flep total kanlanma miktarında kontrol grubuna göre anlamlı fark olduğu saptanmıştır (p=0.005). Marimastat ve doksisiklin verilen grupları karşılaştırıldığında gruplar arasında da istatistiksel olarak anlamlı fark vardır (p=0.036). Marimastat ile çinko sülfat verilen gruplar karşılaştırıldığında marimastat verilen grubun istatiksel olarak anlamlı kanlanma artışı olduğu saptanmıştır (p=0.038). Doksisiklin ve çinko sülfat verilen gruplar arsında anlamlı bir kanlanma artışı saptanmamıştır. Yine aynı şekilde doksisiklin verilen grup ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark saptanmadı. Çinko sülfat verilen grup ve kontrol grubu arasında da anlamlı bir kanlanma artışı saptanmadı.



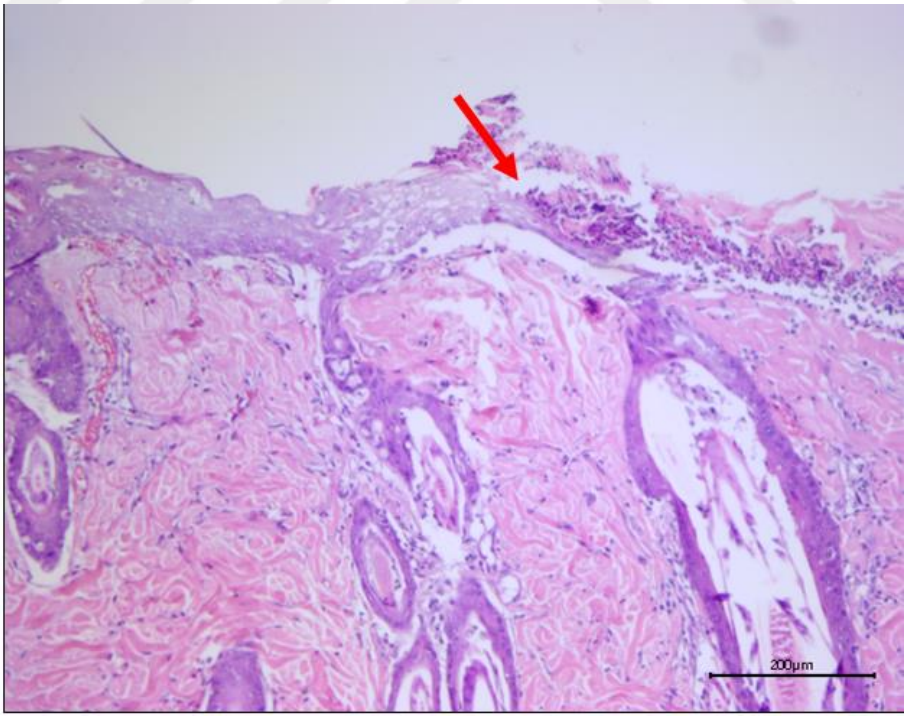
Grafik 2: Tüm grupların hesaplanan kanlanma yüzdesi dağılımları

4.2.İmmunhistokimyasal Bulgular

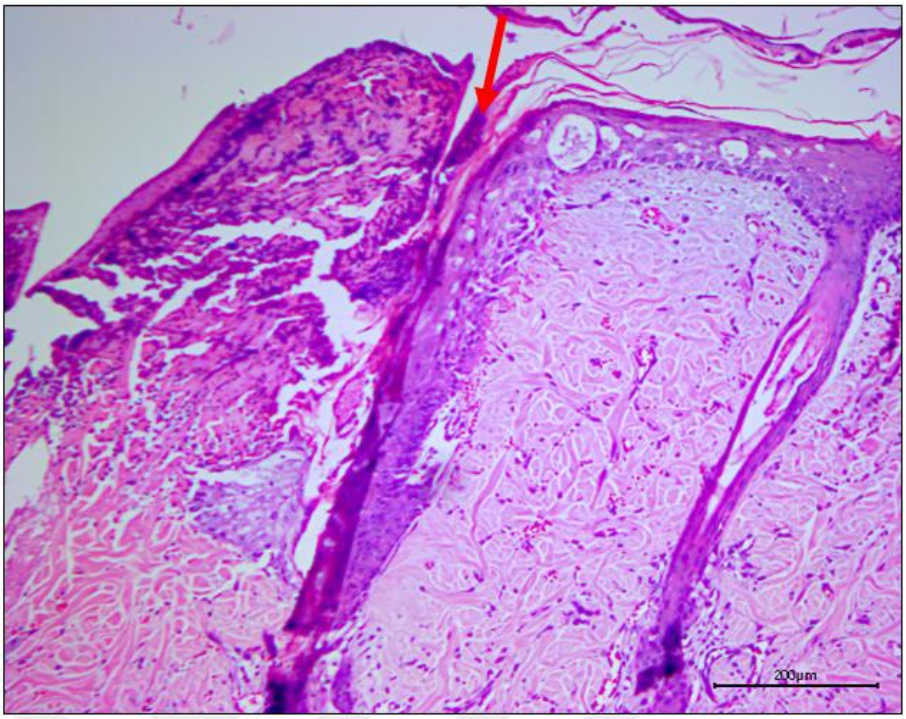
Hematoksilen-Eozin boyaması ve ışık mikroskobu ile yapılan histolojik değerlendirmede; kontrol grubunda cerrahiye bağlı yoğun nekroz, epitelyal hasar ve kas hasarı saptanırken ve yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu görüldü. Çinko sülfat verilen ve marimastat verilen gruplarda kas dokusunda meydana gelen nekrozun daha az olduğu görüldü.



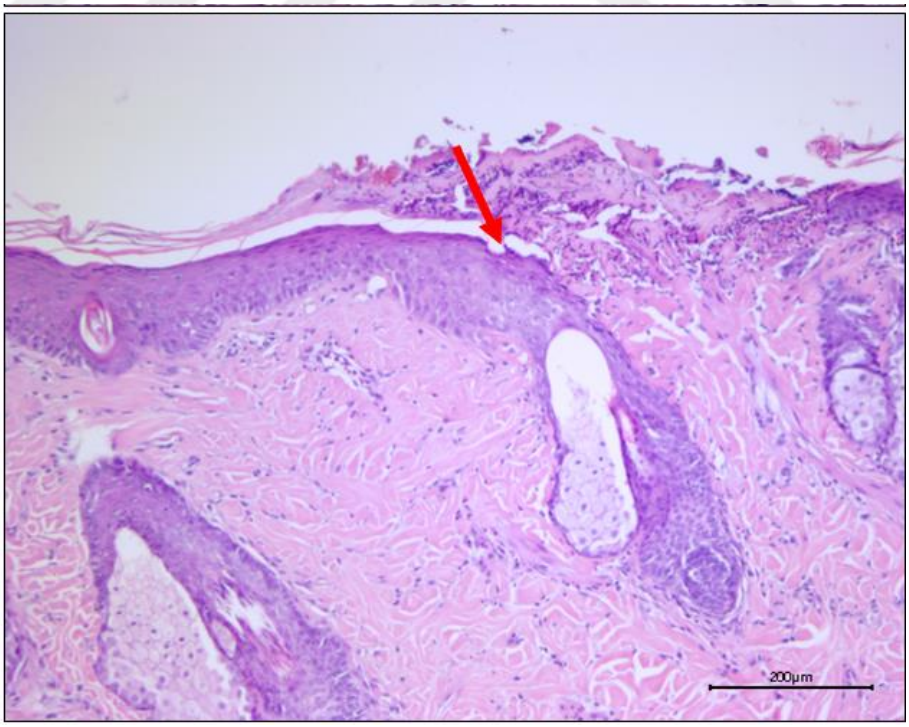
Şekil 36: Kontrol grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü. Kırmızı ok nekroz sağlıklı doku arasındaki geçiş alanı



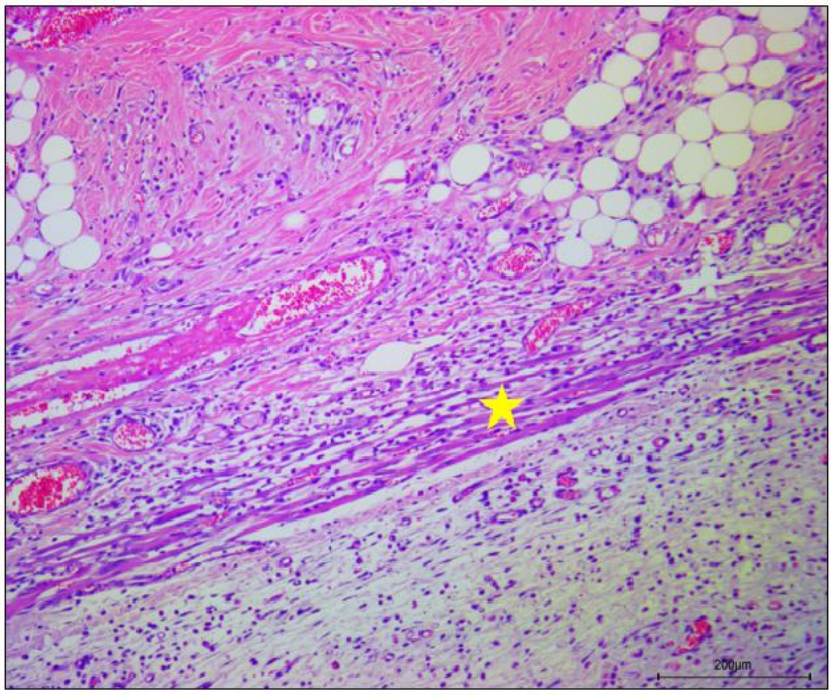
Şekil 37: Çinko Sülfat grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü. Kırmızı ok nekroz sağlıklı doku arasındaki geçiş alanı



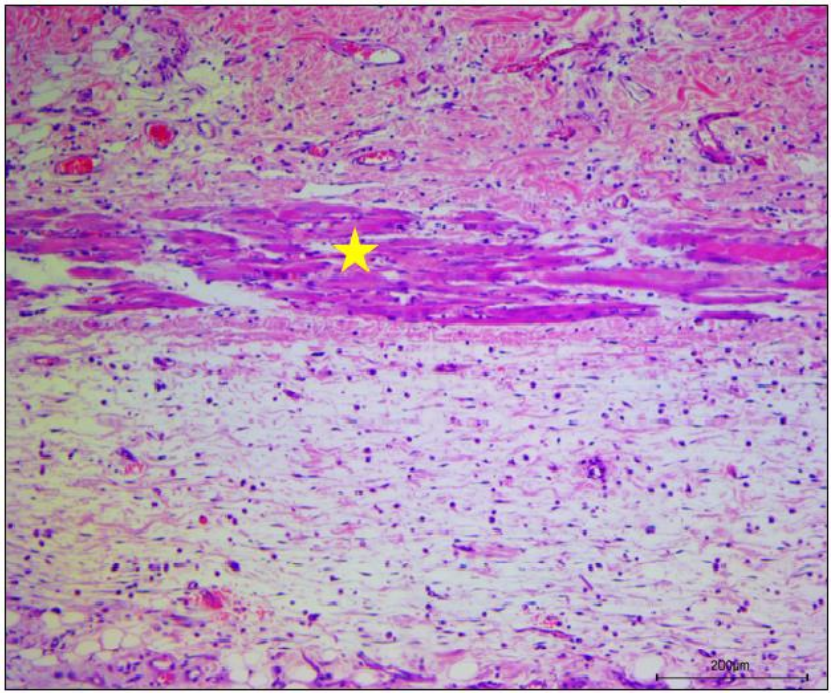
Şekil 38: Doksisiklin grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü. Kırmızı ok nekroz sağlıklı doku arasındaki geçiş alanı



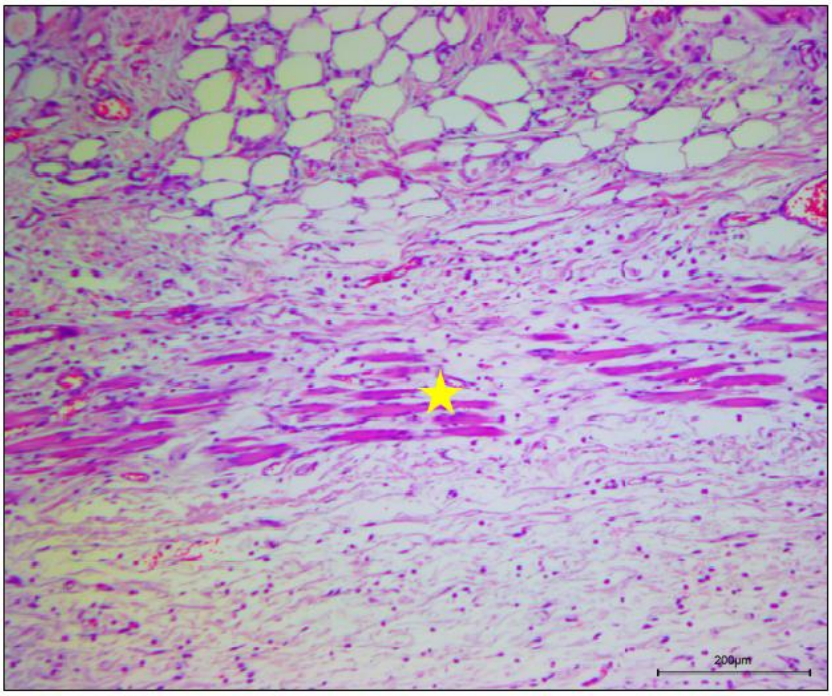
Şekil 39: Marimastat grubu H&E boyanmasının ışık mikroskobik görüntüsü. Kırmızı ok nekroz sağlıklı doku arasındaki geçiş alanı



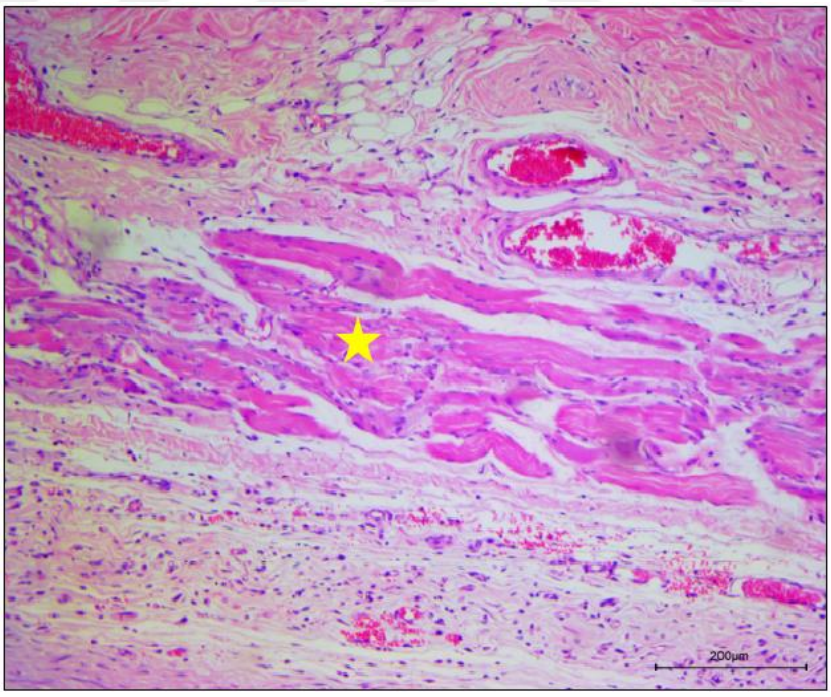
Şekil 40: Kontrol grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik görünümü sarı yıldız nekrotik kas dokusunu göstermekte



Şekil 41: Çinko sülfat grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik görünümü sarı yıldız nekrotik kas dokusunu göstermekte

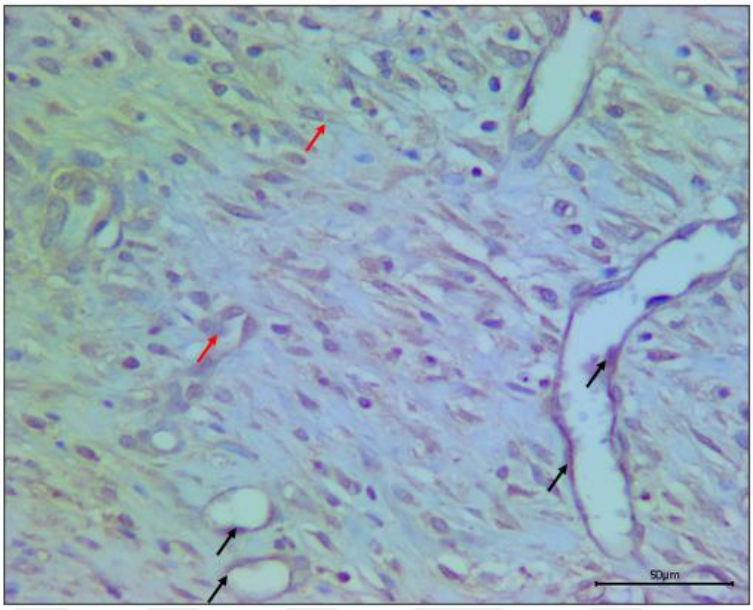


Şekil 42: Doksisiklin grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik görünümü sarı yıldız nekrotik kas dokusunu göstermekte

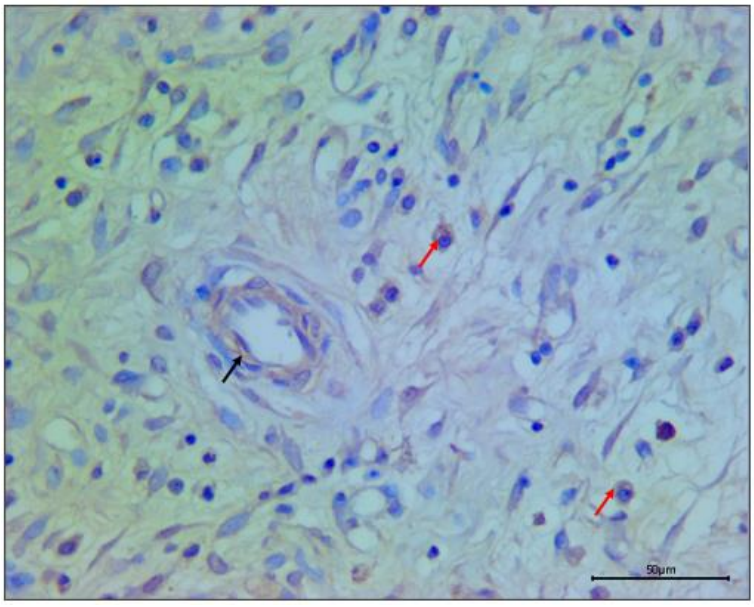


Şekil 43: Marimastat grubu H&E boyamasının ışık mikroskobik görünümü sarı yıldız nekrotik kas dokusunu göstermekte

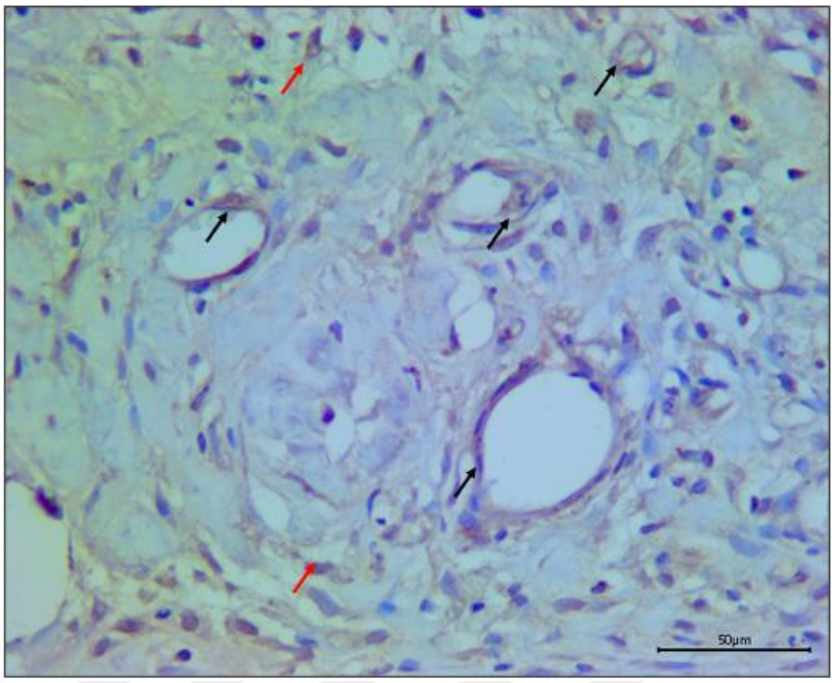
Hematoksilen-Eozin boyamada ışık mikroskobik incelemede çinko sülfat verilen ve marimastat verilen gruplarda kas dokusunda meydana gelen nekrozun doksisiklin ve kontrol grubuna göre daha az olduğu görüldü.



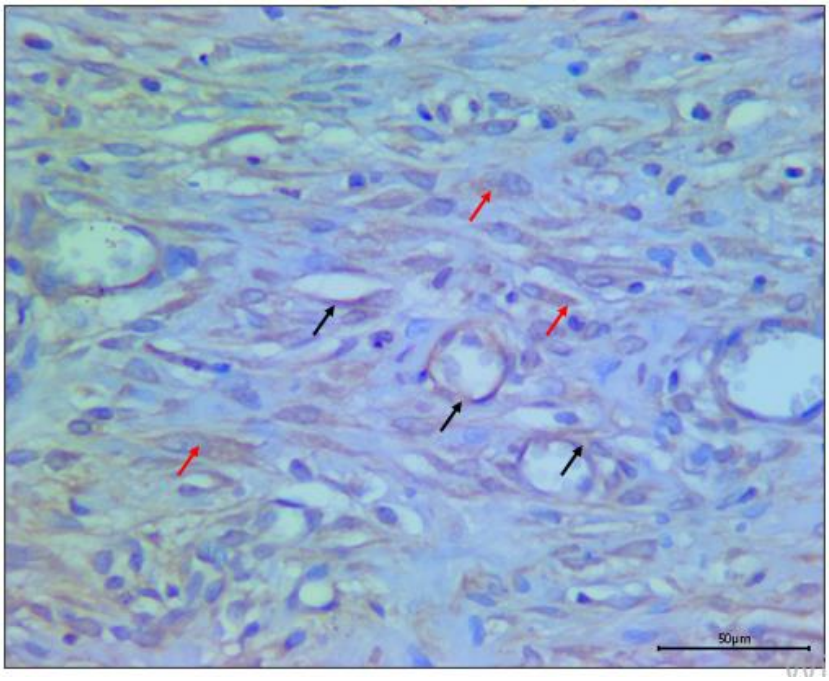
Şekil 44: Kontrol grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok VEGF pozitif endotel hücrelerini, Kırmızı ok ise VEGF pozitif bağ doku hücrelerini göstermekte



Şekil 45: Çinko sülfat grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok VEGF pozitif endotel hücrelerini, Kırmızı ok ise VEGF pozitif bağ doku hücrelerini göstermekte

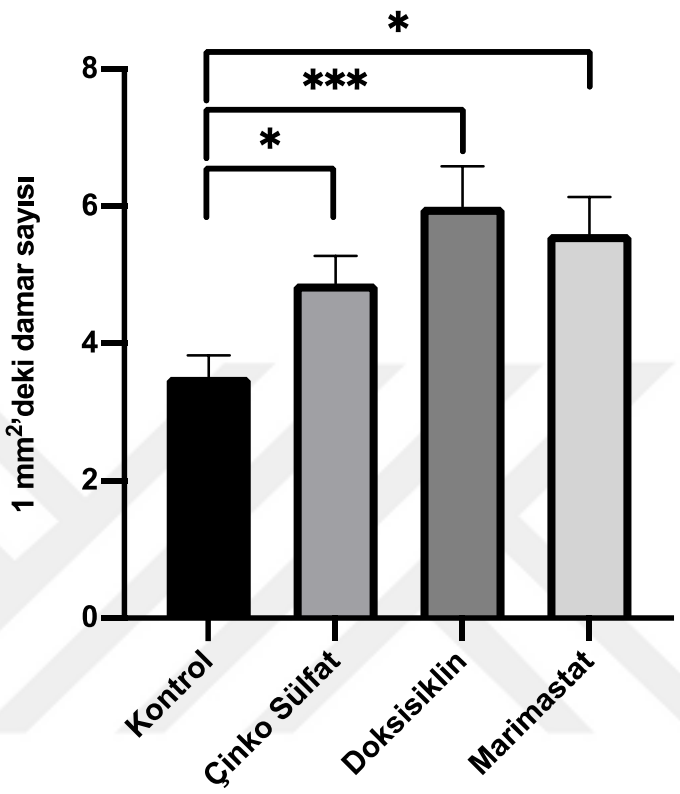


Şekil 46: Doksisiklin grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok VEGF pozitif endotel hücrelerini, Kırmızı ok ise VEGF pozitif bağ doku hücrelerini göstermekte



Şekil 47: Marimastat grubu VEGF İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok VEGF pozitif endotel hücrelerini, Kırmızı ok ise VEGF pozitif bağ doku hücrelerini göstermekte

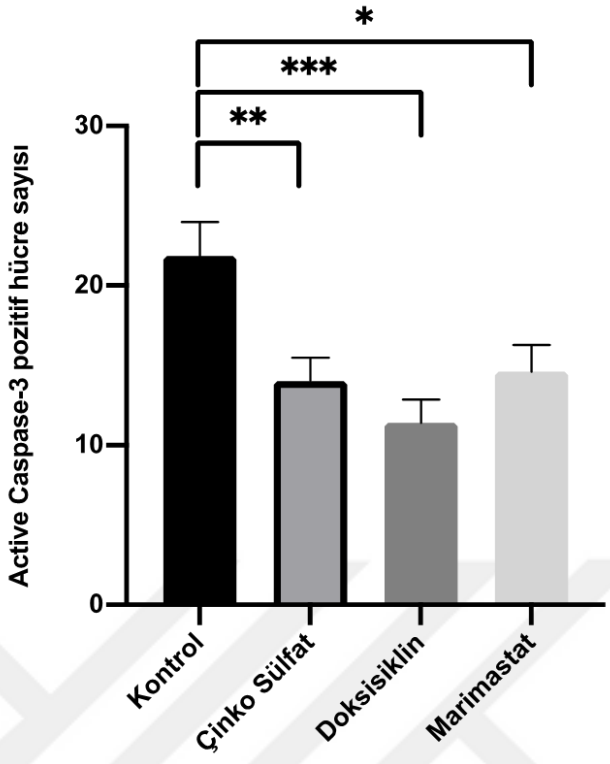
Geçiş bölgesindeki yeni damar oluşumları sayıldığında doksisiklin, marimastat ve çinko sülfat verilen gruplarda kontrol grubuna kıyasla anlamlı artış olduğu görüldü. En yoğun damar oluşumunun doksisiklin verilen grupta olduğu görüldü.



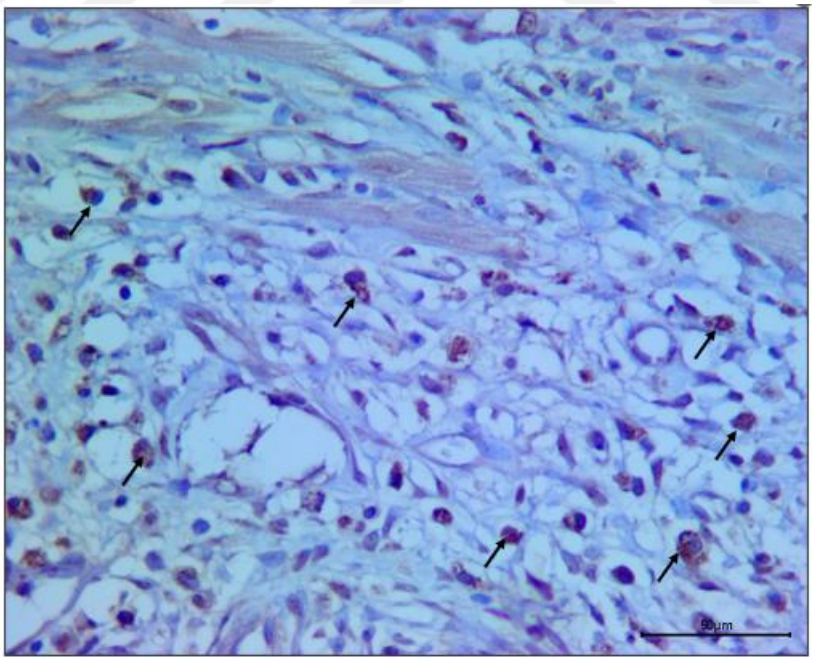
Grafik 3: Gruplar arasında flep damar sayımı sonuçları

Neovaskülarizasyona bakıldığında 3 grupta da damar sayısı artmış olarak saptanmasına rağmen marimastat ve çinko sülfat grubu arasında anlamlı fark saptanmadı (p=0,9231). Doksisiklin ile marimastat verilen gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında anlamlı fark saptanmadı (p=0,2526). Yine doksisiklin ve çinko sülfat verilen gruplar istatistiksel olarak karşılaştırıldığında damar sayısı artışı anlamlı bulunmadı (p=0,2523).

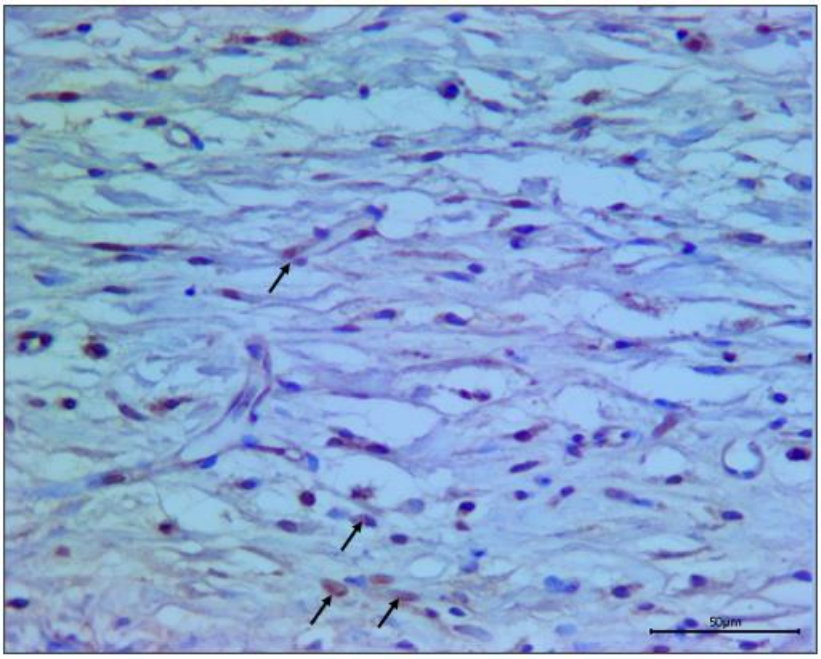
Apopitotik hücre sayımı açısından değerlendirildiğinde kontrol grubu ile karşılaştırıldığında marimastat, çinko sülfat ve doksisiklin verilen grupta anlamlı olarak apopitotik hücrelerin azaldığı görüldü.



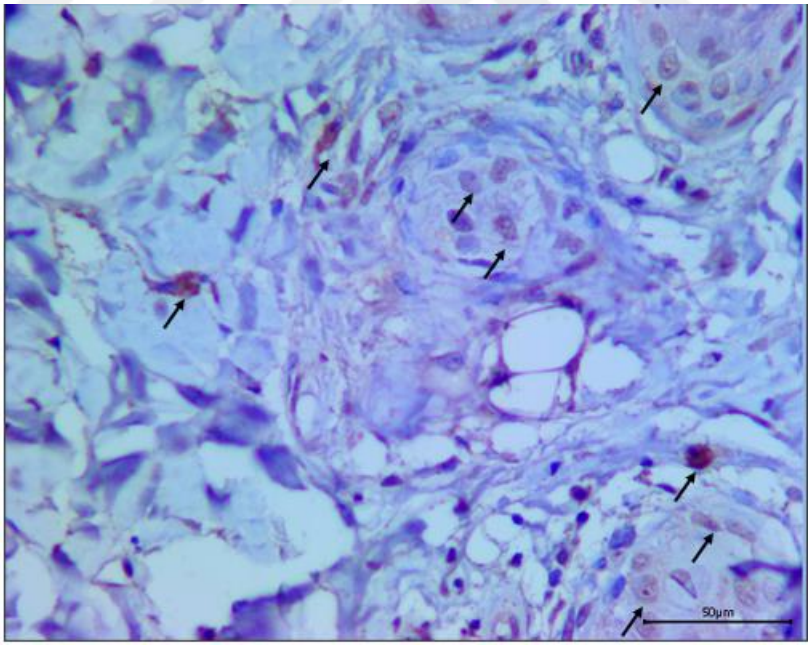
Grafik 4: Gruplar arasında aktive Caspase-3 pozitif hücre sayısı



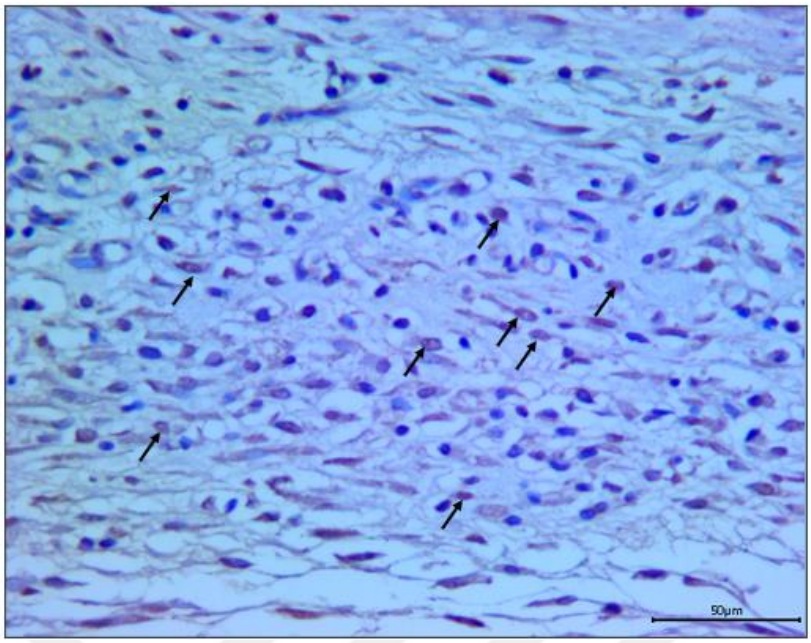
Şekil 48: Kontrol grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok aktive caspase-3 pozitif hücreler



Şekil 49: Çinko sülfat grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok aktive caspase-3 pozitif hücreler



Şekil 50: Doksisiklin grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok aktive caspase-3 pozitif hücreler



Şekil 51: Marimastat grubu aktive Caspaz-3 İmmunohistokimyasal boyama; Siyah ok aktive caspase-3 pozitif hücreler

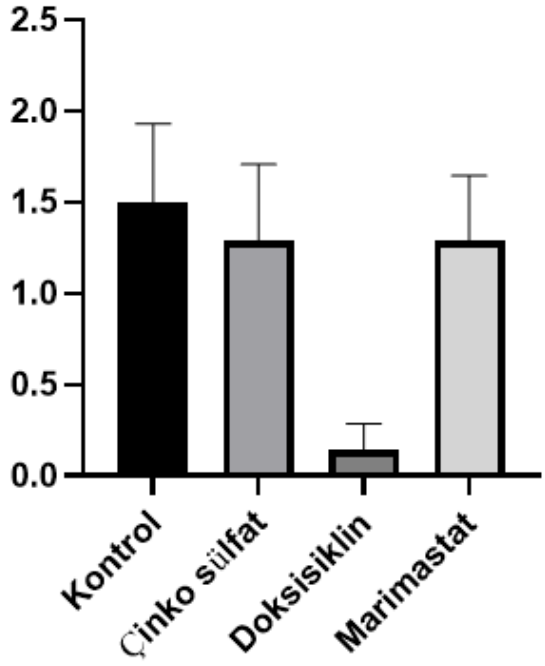
Tablo 6: Tanımlayıcı İstatistikler Tablosu

Değişken	**Kontrol Ort. ± Std. Sapma**	**Çinko Sülfat Ort. ± Std. Sapma**	**Doksisiklin Ort. ± Std. Sapma**	**Marimastat Ort. ± Std. Sapma**	***p* değeri**
Damar Sayısı	3,51±0,30	4,87±0,40	6,00±0,58	5,60±0,53	0,010
Aktive Caspase-3 pozitif hücre sayısı	21,87±2,13	14,03±1,45	11,40±1,45	14,62±1,66	0,003

Cerrahi sonrası fleplerde inflamasyon, ödem, mononükleer hücre infiltrasyonu, kapiller artışı bakıldı, bu kriterler subjektif olarak değerlendirildi. Değerlendirme yapılırken 0-3 arası puanlama yapılarak bir çizelge oluşturuldu.

Tablo 7: Histopatolojik değerlendirme ölçütleri ve puanlaması

0	**Yok**
1	Minimal reaksiyon, ödem ve mononükleer hücre infiltrasyonu
2	Orta düzeyde artmış ödem, yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu
3	Geniş alanda yangısal reaksiyon ve kapiller artışı, kıl folikülleri ve komşu alanlarda yoğun mononükleer hücre infiltrasyonu



Grafik 5: Gruplar arasındaki histopatolojik değerlendirmesi

Histopatolojik değerlendirme sonuçlarına bakıldığında doksisiklin verilen grupta inflamasyon bulgularında istatiksel olarak anlamlı düşüş olduğu izlendi. Marimastat ve çinko sülfat verilen grupta ise sonuçlar hemen hemen birbirine benzer olduğu en yüksek inflamasyon bulgularının ise kontrol grubunda olduğu izlendi.

Tablo 8: Histopatolojik değerlendirme tanımlayıcı istatistikler tablosu

Değişken	**Kontrol Ort. ± Std. Sapma**	**Çinko Sülfat Ort. ± Std. Sapma**	**Doksisiklin Ort. ± Std. Sapma**	**Marimastat Ort. ± Std. Sapma**	***p* değeri**
İnflamasyon bulguları	1,500±1,04	1,286±1,11	0,1429±0,37	1,286±0,95	0,048

5.TARTIŞMA

Rekonstrüktif cerrahide tümör eksizyonu veya travmaya sekonder meydana gelen doku kayıplarının onarımında rekonstrüksiyon merdivenine göre en basitten en karmaşık yönteme doğru onarım yapılır. Rekonstrüksiyon merdivenine göre sekonder iyileşme, primer onarım, deri grefti ile onarım, lokal flepler, uzak ve serbest flepler şeklinde bir sıralama takip edilerek onarım yapılır. Geleneksel yaklaşıma ek olarak, son dönemlerde rekonstrüksiyon asansörü yaklaşımı ortaya atılmıştır. Buna göre rekonstrüksiyon yapılacak bölgenin ihtiyaçları göz önünde bulundurularak kar-zarar dengesine göre geleneksel yaklaşımın aksine basamak yaklaşımı yerine, bazı basamakların atlanarak bir üst basamağa direk geçilebileceğini savunur.[87] Bu yaklaşımlardan her ikisi için de flep cerrahisi önemli bir yer tutar. Gelişen teknikler, artan bilgi birikimi, anatomik çalışmalar ve Anjiyozomların bilinmesine rağmen flep distalinde meydana gelen iskemi ve nekroz hala önemli bir sorun oluşturmaktadır. Milton, Sasaki, Kerrigan ve Daniel gibi birçok araştırmacı, cerrahi flep elevasyonu sonrası meydana gelen fizyolojik olayları ve fleplerin transferleri hakkında önemli bilgiler ortaya koyan sayısız çalışmalar ortaya koymuştur.[31,88,89]

Gerek random paternli gerekse de aksiyel paternli fleplerde flep distalinde kan akımının azalmasına bağlı olarak iskemi ve nekroz meydana gelmektedir. Flep distalinde meydana gelen nekroz ek cerrahi işlem gerektirmekte ve hastane kalış süresini uzatmakta aynı zamanda tedavi maliyetinde artışa neden olmaktadır. Bu nedenle flep distalinde meydana gelen nekrozu ve iskemiyi azaltmaya yönelik birçok araştırma yapılmıştır.

Birçok etken flep kaybına neden olmaktadır. Yetersiz kan akımı, flebin yanlış dizaynı, cerrahi teknikte yetersizlik, enfeksiyon, hematom, seroma ve vasküler patolojiler flep kaybına sebep olan en sık etkenlerdir. Yapılan deneysel çalışmaların büyük bir kısmı bu etkenleri ortadan kaldırmaya ve flep kan akımını artırmaya yönelik çalışmalardır.[48,90–92]

İdeal koşullar altında, uygun olmayan doku perfüzyonundan kaynaklanan hipoksi, iyileşme sürecinde yeterli kan akışını sağlamak için anjiyogeneze yol açan adaptif bir cevaba yol açmalıdır. [93–95] Anjiyogenez, birkaç hücre tipini ve düzinelerce

mediatör ve sinyal yolunu içeren karmaşık bir mekanizmadır. Bu olaylar dizisi, endotel hücrelerinin göçü ve invazyonu ile başlatılır, bunu lümen oluşumu, yeni vasküler segmentlerin önceden var olan dolaşımla bağlantısı ve yeterli matriks metalloproteinaz (MMP) aktivitesine bağlı bir süreç olan ekstraselüler matriksin yeniden şekillenmesi izler. [93] Ayrıca tüm bu süreçte yer alan birçok sinyal yolu arasından vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF) ve hipoksi ile indüklenebilir faktör 1α (HIF-1α) özellikle kritik bir role sahiptir.[95]

Matriks metalloproteinazlar (MMP'ler) ekstrasellüler matriksin yıkımının önemli bir aşamasını gerçekleştirirler. MMP'ler, ESM bileşenlerini seçici olarak parçalayan 28 endopeptidazdan oluşan bir ailedir. Bu enzimler, fibroblastlar, epitelyal, düz kas, endotel ve inflamatuar hücreler dahil olmak üzere çeşitli hücre tipleri tarafından üretilir.[68,96,97] MMP'lerin aktivitesi, anjiyogenez sırasında endotel hücrelerinin migrasyonuna izin vermek için vasküler bazal membran yıkımı ve ESM yeniden şekillenmesi için gereklidir.

Normal şartlar altında, ESM dinamiği ESM proteinlerinin üretimi ve MMP'lerin protein degradasyonu ile dengelenir. Bu yapım ve yıkım dengesi MMP'lerin artışı yönünde olursa yara iyileşmesi bozulabilir. MMP'ler, diğer MMP'lerin yanı sıra reaktif oksijen türevleri ve reaktif azot türevleri dahil olmak üzere farklı mekanizmalarla aktive edilebilen gizli proenzimler olarak salgılanır.[98–100] MMP aktivitesinin düzenlenmesi, proenzim aktivasyonu, transkripsiyon sonrası modifikasyon[98] ve metalloproteinazların doku inhibitörleri ailesi (TIMP'ler) tarafından meydana gelen ek bir kontrol dahil olmak üzere birçok seviyede gerçekleşir.

Endotel hücreleri yapısal olarak pro-MMP-2 salgılar ve bu hücrelerin bazal membranın bozulmasından sonra tip I kolajene maruz kalması veya TNF-α gibi proinflamatuar sitokinlere maruz kalması MT1-MMP (membran tip-1 Matriks metalloproteinaz) ekspresyonunu arttırır, bu da daha sonra pro-MMP-2'nin aktivasyonunu indükler.[68] Esteves ve ark.nın yaptığı çalışmada 660 nm dalga boyunda lazer uygulandığında TNF-α'nın azaldığı ve flep yaşabilirliğinin arttığını bulmuşlardır.[101] Bu çalışmalar doğrultusunda TNF-α'nın artması sonucu pro-MMP-2'nin arttığı ve sonuç olarak flep yaşayabilirliği üzerinde olumsuz etkisi olduğu

düşünüldüğünde bizim çalışmamızda da MMP-2 inhibitörü olan marimastatın verildiği grupta flep kanlanmasının anlamlı(p=0.005) olarak arttığı ve flep nekrotik alanında anlamlı(p=0.002) azalma olduğunun gösterilmesi bu çalışmaları desteklemektedir.

Hamano ve ark.nın yaptığı çalışmada MMP-9'un, kolajen alfa-3(IV) zincirinden kolajen olmayan alanın (NC1) proteolizi yoluyla anjiyojenik ve tümöral baskılayıcı tümstatini ürettiği ve tümstatinin de anjiogenezisi endotel hücrelerinde proliferasyonunu inhibe ederek ve alfaVbeta3 integrin ile etkileşime girerek apoptozu indükleyerek inhibe ettiğini göstermişlerdir.[102] Bizde çalışmamızda geniş spektrumlu MMP inhibitörü olan marimastat (MMP-1, 2, 7, 9 inhibitörü) kullanarak anjiogenezisin artmış olduğunu gösterdik.

Vivian ve ark. nın yaptığı rat iskemik deri flebi çalışmasında düşük doz lazer tedavisi verildiğinde VEGF ve HIF-1α'nın arttığı, MMP-2'nin ise azaldığı gösterilmiştir. Aynı zamanda anjiyogenezin arttığı gösterilmiştir.[70] Ulrich ve ark.nın yaptığı çalışmada ise kronik yara eksüdasında MMP-2ve MMP-9'un artmış olduğunu bunun ise antianjiyojenik etki gösterdiğini göstermişlerdir.[103] Bizim çalışmamızda ise flep cerrahisi uygulanmış ratlarda matriks metalloproteinaz aktivatör ve inhibitörleri verilen gruplarda kontrol grubuna göre anjiyogenezin anlamlı (p=0,0109) şekilde artmış olduğu ve en yüksek anjiyogenezin doksisiklin verilen grupta olduğu gösterilmiştir.

Zhang ve ark.nın yaptığı çalışmada rat TRAM flebi eleve edilmeden önce flebe VEGF'nin preoperatif subkutan enjeksiyonunun, anjiyogenezi indükleyebildiğini ve TRAM flep yaşayabilirliğini iyileştirebildiğini bulmuşlardır.[104] Linewear ve ark.nın yaptığı bir diğer çalışmada ise cerrahi geciktirme prosedürünün rat TRAM flep modelinde VEGF ekspresyonunun artmasına neden olarak flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir.[92]

Flep yaşayabilirliğini artırdığı ispatlanmış yöntem cerrahi geciktirme yöntemidir. Flep cerrahisinin gelişmeye başladığı dönemlerde flep yaşayabilirliğinde

pedikül genişliğinin artmasıyla daha uzun flepler planlanabileceği düşünülmüş olsa da bu görüşün yanlış olduğu Milton ve Daniel tarafından ortaya konulmuştur. Milton ve Daniel yaptığı bu çalışmada domuzlarda değişen pedikül kalınlığında eleve edilen random paternli fleplerde flep distalinde meydana gelen nekrozda ve yaşayabilen flep uzunluğunda değişiklik olmadığını göstermişlerdir.[105,106] Flep yaşayabilirliğini artırmak için perfüzyon basıncının artırılması gerekmektedir. Pedikül kalınlığının artırılması flebe aynı basınca sahip ek damarlar eklemektedir. Flep yaşayabilirliğini artırmanın bir diğer yolu da flebe dahil edilecek direkt bir arter veya geniş bir perforatör sayesinde random paternli bir flebi aksiyel paternli hale getirmektir. Bu durum her zaman mümkün olamamakla birlikte, rekonstrüktif cerrah için çoğu zaman random paternli flepler kullanılma durumunda kalınmaktadır.

Cerrahi geciktirme flep cerrahisinde flep yaşayabilirliğinde en etkili yöntem olduğu ispatlanmıştır.[107] Bununla birlikte cerrahi geciktirme için ameliyat sayısının artması ve belirli bir süre beklenilmesi nedenli maliyetli ve zaman kaybettiricidir. Bu sebeple cerrahi geciktirme hasta ve cerrah için çok da talep edilen bir yöntem olamamıştır. Sonraki dönemlerde cerrahi geciktirmenin etkilerini gösterecek fakat cerrahi dışı farmakolojik tedavi ile aynı etki oluşturulması amaçlanmış ve bu amaçla geciktirme yönteminin mekanizması anlamaya çalışılmıştır.[83,108,109] Flep yaşayabilirliğini artırması açısından cerrahi geciktirme ile eşdeğer bir farmakolojik tedavi modalitesinin bulunamamış olması sebebiyle araştırmalar devam etmektedir.

Gecikme fenomeninde kan akışının artmasının anjiyogeneze atfedilip atfedilemeyeceği tartışmalıdır. Pang ve ark. nın domuzlar üzerinde yaptığı çalışmada flep kan akımının 2-3. Günlerde artmaya başladığını 4-14. Günlerde ise sabitlendiğini ve histolojik olarak değerlendirildiğinde ise anjiyogenezde artış olmadığını göstermişlerdir. Bu sebeple gecikme fenomeninin anjiyogeneze bağlı olmadığı sonucuna varmışlardır. Vazodilatasyona neden olan nörohumoral maddelerin lokal salınımının flep yaşayabilirliğinden sorumlu olduğuna inanıyorlardı.[110] Buna karşılık, Ortega ve ark., immunohistokimyasal bir teknik kullanarak yaptıkları tavşan flep çalışmasında cerrahi geciktirmeden sonraki 3-7 gün içinde ciltte önemli bir anjiyogenezis olduğunu bulmuşlardır.[111,112] Bizim çalışmamızda ise anjiyogenez her 3

deney grubunda da kontrol grubuna göre anlamlı (p=0,0109) artmış olduğu bulundu. Bununla birlikte flep nekroz oranın anlamlı (p=0.002) olarak en az ve flep kanlanma oranının anlamlı (p=0.005) olarak fazla olduğu grup marimastat verilen gruptu. Anjiyogenezin artmış olduğu diğer 2 grupta (çinko sülfat verilen ve doksisiklin verilen gruplar) ise flep nekroz oranının ve flep kanlanma miktarında kontrol grubuna göre anlamlı bir fark saptanmadı.

Birçok çalışma, matriks metalloproteaniazların (MMP'ler) tümör büyümesini, invazyonunu ve metastazını desteklediğini göstermiştir. MMP'ler; reseptörleri, hücre dışı matris proteinlerini, PARP'leri bozabilir ve apoptotik maddeleri serbest bırakabilir.[113] MMP'ler hem pro-apoptotik hem de anti-apoptotik aktivite sergiler. Anti-apoptotik etkileri, Fas ligandını parçalamayı, tümörle ilişkili MHC kompleksi sınıf I ile ilgili proteinin proteolitik dökülmesini ve serin/treonin kinaz AKT/Protein kinaz B'nin aktivasyonunu içerir.[114] Günümüzde kanser tedavisinde kritik konulardan biri birçok tümörün tek ajanlı tedaviye dirençli hale gelmesidir.[115,116] Bu nedenle MMP'lerin apopitozis üzerindeki etkisini araştırma amacıyla çalışmalar sürmektedir. Bazı çalışmalar, MMP'lerin inaktif membrana bağlı formlarından büyüme faktörlerini serbest bırakarak tümör büyümesini desteklediğini bildirmiştir.[117,118] MMP antagonistlerinin hücre büyümesini inhibe edeceğini öne sürerken, diğer çalışmalar MMP inhibitörlerinin membrana bağlı inaktif formlarından TRAIL ve TNFα gibi ligandların salınımı yoluyla apoptozu indükleyerek tümör proliferasyonunu inhibe ettiğini bildirmiştir.[119]Ayrıca, MMP inhibitörleri strese bağlı membrana bağlı reseptörlerin dökülmesinin inhibisyonunda rol oynamıştır.[120–123] Bununla birlikte, bu çalışmalar MMPI'lerin tümör büyümesini, invazyonunu ve metastazını antagonize ettiği kesin mekanizmaları henüz net bir şekilde aydınlatamamıştır. Bir diğer çalışmada ise spesifik MMP-2/MMP-9 inhibitörünün kanser hücrelerinde pro-apopitotik aktivitesi olduğunu göstermiştir.[124] Tümör hücreleri genellikle apoptoza dirençlidir. Bu, apoptozu kontrol eden genlerdeki mutasyonlar, anti-apoptotik proteinlerin aşırı ekspresyonu ve pro-apoptotik proteinlerin azalmış ekspresyonu dahil olmak üzere bir dizi faktöre bağlıdır. Bizim çalışmamızda ise kontrol grubuna göre her 3 grupta da apoptoz anlamlı (p=0,0036) olarak azaldı. Kanser hücrelerinde MMP inhibitörlerinin apoptozu artırmasına rağmen bizim çalışmamızda MMP hem aktivatör

hem de inhibitörlerinin normal hücrelerde apoptozu azaltıcı etkisinin olması kanser hücrelerinde MMP gen ekspresyonunun, aktivasyonunun artmış olması ve inhibisyonunun azalmış olmasına bağlı olarak meydana gelen bozulmuş MMP/TIMP dengesinden kaynaklanabilir.

Flep yaşayabilirliğinin artırılmasında bir diğer mekanizma ise MMP aktivatör ve inhibitörlerinin meydana getirdiği antiapopitotik etkinliktir. Apoptozun iskemik hasara bağlı hücre ölümüne katkıda bulunduğu düşünüldüğünde bu özellik, alternatif bir mekanizma olarak kabul edilebilir.

İnflamasyon birçok yoldan etki ederek flep yaşayabilirliğini olumsuz yönde etkileyebilir. Vazokonstriksiyona yol açarak flep kan akışını azaltarak doku iskemisi ve nekrozuna neden olabilir. Meydana gelen ödem sonucunda flep üzerindeki basıncı artırarak kan akışını bozabilir. Bir diğer mekanizma ise serbest radikallerin salınması ile hücre ve dokulara zarar verilmesidir.[125–129] Flep yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla inflamasyonu baskılamaya yönelik deneysel birçok çalışma yapılmıştır. Biz de yaptığımız çalışmada gruplar arasındaki inflamasyonu değerlendirmek istedik. Her 3 grupta da kontrol grubuna göre inflamasyonda anlamlı (p=0,048) azalma olduğu ancak doksisiklin verilen grupta diğer gruplara göre daha fazla azalma olduğunu bulduk. Ancak flep nekroz oranı en az olan grup marimastat verilen gruptu.

Antioksidanlar, anti-inflamatuar ajanlar, büyüme faktörleri ve otofaji indükleyicileri gibi apoptozu inhibe edebilen stratejiler, hücre sağkalımını, doku bütünlüğünü ve kan akışını koruyarak flep canlılığını artırabilir.[130–132] Bizim çalışmamızda da apoptozun ve inflamasyonun anlamlı (p=0,0036/0,048) olarak azalması ve marimastat verilen grupta flep yaşayabilirliğinin artmış olması bu çalışmaları desteklemektedir.

İnflamasyonun hipertrofik skar oluşumuna katkıda bulunduğu bilinmektedir. İnflamasyon, yara iyileşmesi için çok önemlidir ve patojenlere karşı yeterli savunmanın yanı sıra yara bölgesini debrislerden temizlemek için gereklidir. Bununla birlikte, yarada şiddetli inflamasyon oluşması hipertrofik skar oluşumunu

etkileyebilir.[133,134] MMP'ler hipertrofik skar oluşumunda rol oynar. MMP-2, MMP-9 ve TIMP-1 gen ekspresyonundaki artış, hipertrofik skar oluşumunda yer alabilirken, MMP-2 ve MMP-9 gen ekspresyonundaki azalma, hipertrofik skarların olgunlaşmasıyla ilişkili olabilir.[135] MMP-1, yüksek epitel hiperplazisi olan derinin yara iyileşme sürecini iyileştirir ve hayvan modelinde skar oluşumunu azaltır. Bu nedenle, MMP-1 potansiyel olarak hipertrofik skarın önlenmesi veya tedavisi için etkili bir anti-fibrojenik ajan olarak kullanılabilir.[136] Bizim çalışmamızda da her 3 ajanın verildiği grupta inflamasyonun anlamlı (p=0,048) azaldığı gösterilmiş olup ilerleyen çalışmalarda bu ajanlar hipertrofik skar oluşumunun önlenmesinde kullanılması düşünülebilir. Ancak bu konuda daha fazla bilimsel çalışma yapılması gerekmektedir.

6.SONUÇLAR

MMP'ler organizmada ESM ve hücre etkileşimi aracılığıyla birçok fizyolojik olayda aktif rol oynar. MMP aktivitesi çeşitli yolaklar aracılığıyla dengede tutulur. Yapılan birçok çalışmada MMP'lerin anjiyogenez, inflamasyon ve apoptoziste rol oynadığı gösterilmiştir. Bizde çalışmamızda MMP'lerin bu özelliklerini baz alarak aktivatör ve inhibitörlerinin flep yaşayabilirliği üzerinde olan etkisi literatürde ilk defa incelenmiştir.

Yapılan çalışmada geniş spektrumlu MMP inhibitörü olan marimastatın flep yaşayabilirliğini artırdığı gözlenmiştir. Daha önce yapılan tüm in vivo çalışmalar tümör hücrelerinde anti-anjiyojenik olduğunu göstermiş olsa da normal hücreler üzerinde tam tersi yönde etki ederek anjiyogenezi artırmış ve aynı zamanda flep perfüzyonunda da artışa sebep olmuştur.

Yine yapılan kanser çalışmalarında MMP-2/MMP-9 inhibitörlerinin pro-apopitotik olduğu yönünde olsa da bizim çalışmamızda tam tersi apoptozu azaltma yönünde etki göstermiştir. Ve bu da flep yaşayabilirliği üzerinde olumsuz etkiye sebep olan bir faktör olan apoptozu azaltarak flep nekroz oranını azaltmıştır.

Marimastat üretiminin pahalı olması, soğuk zincirde saklanması, yan etki profilinin bilinmemesi ve deney aşamasında olması dezavantaj oluşturmaktadır. Bu dezavantajlar ortadan kaldırıldığı takdirde klinik olarak kullanılabilecektir.

Doksisiklin uzun süredir piyasada olan, yan etki profili bilinen bir bakteriostatik antibiyotiktir. Çalışmamızda doksisiklin verilen grupta flep yaşayabilirliği üzerine belirgin etkisi gösterilmemekle birlikte inflamasyonun belirgin olarak azalmış olması nedeniyle inflamasyon ve hipertrofik skar arasındaki ilişki göz önünde bulundurulduğunda doksisiklinin hipertrofik skar önlemede kullanılabileceğini düşündürmektedir. Ancak daha fazla çalışma yapılması gerekmektedir.

Flep yaşayabilirliği üzerine birçok çalışma yapılmış olmasına rağmen cerrahi geciktirme kadar etkin bir tedavi bulunamamıştır. Bu nedenle flep cerrahisi üzerinde çalışmalar devam etmektedir. MMP'lerin organizmada meydana getirdiği etki mekanizması hâlâ tam olarak anlaşılmış değildir. MMP'ler ile ilgili bilgi birikimi arttıkça ve spesifik moleküller üretildikçe daha etkin ve güvenli tedavi protokolleri oluşturulabilir.

7.KAYNAKLAR

1. Bai Y, Han Y, Yan X, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(2):310–317.
2. Liu G, Bao Z, Wu J. Injectable baicalin/F127 hydrogel with antioxidant activity for enhanced wound healing. *Chinese Chem Lett*. 2020;31(7):1817–1821.
3. Xian C, Gu Z, Liu G, Wu J. Whole wheat flour coating with antioxidant property accelerates tissue remodeling for enhanced wound healing. *Chinese Chem Lett*. 2020;31(6):1612–1615.
4. Zhang Y, Karki R, Igwe OJ. Toll-like receptor 4 signaling: A common pathway for interactions between prooxidants and extracellular disulfide high mobility group box 1 (HMGB1) protein-coupled activation. *Biochem Pharmacol*. 2015;98(1):132–143.
5. Cabral-Pacheco GA, Garza-Veloz I, Castruita-De la Rosa C, et al. The Roles of Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors in Human Diseases. *Int J Mol Sci*. 2020;21(24):9739.
6. Venus M, Waterman J, McNab I. Basic physiology of the skin. *Surg*. 2010;28(10):469–472.
7. Kolarsick P, 2011 U. Anatomy and physiology of the skin. .
8. Ramadon D, McCrudden MTC, Courtenay AJ, Donnelly RF. Enhancement strategies for transdermal drug delivery systems: current trends and applications. *Drug Deliv Transl Res*. 2022;12(4):758–791.
9. Lucas JB. The Physiology and Biomechanics of Skin Flaps. *Facial Plast Surg Clin North Am*. 2017;25(3):303–311.
10. Hom DB, Goding GS. Skin flap physiology. 2007 January 1 Epub.
11. Zenn MR, Jones G. Reconstructive Surgery Anatomy, Technique, and Clinical Applications. Karen Berger; 2012.
12. Charkoudian N. Skin Blood Flow in Adult Human Thermoregulation: How It Works, When It Does Not, and Why. *Mayo Clin Proc*. 2003;78(5):603–612.

13. Prostacyclin Formation in Delayed Pig Flank Flaps : Annals of Plastic Surgery. Available at: https://journals.lww.com/annalsplasticsurgery/Abstract/1984/10000/Prostacyclin_Formation_in_Delayed_Pig_Flank_Flaps.5.aspx. Accessed January 17, 2023.
14. Daniel RK, Kerrigan CL. Skin Flaps: An Anatomical and Hemodynamic Approach. *Clin Plast Surg*. 1979;6(2):181–200.
15. Nelson MT. Bayliss, myogenic tone and volume-regulated chloride channels in arterial smooth muscle. *J Physiol*. 1998;507 (Pt 3(Pt 3):629.
16. Cole DJ, Drummond JC, Osborne TN, Matsumura J. Hypertension and hemodilution during cerebral ischemia reduce brain injury and edema. *Am J Physiol Circ Physiol*. 1990;259(1):H211–H217.
17. Kim KZ, Thompson DH, George TF, McQuillan PM, Kao T. Effect of Anemia on Survival of Myocutaneous Flaps in the Pig. *Otolaryngol Neck Surg*. 1994;111(4):509–512.
18. Platt AJ, Robertson A, Batchelor AG. Successful free flap transfer and salvage in sickle cell trait. *Br J Plast Surg*. 2000;53(8):707–708.
19. Daniel R KC. Principle and physiology of skin flap surgery. Philadelphia,USA; 1990.
20. Fisher J GM. Basic Principles of Skin Flaps. Baltimore, USA; 1997.
21. Thorne CH. Techniques and principles in plastic surgery. Thorne CH(Ed) Grabb and Smith's Plastic Surgery. New York; 2014.
22. Saint-Cyr M, Schaverien M V., Rohrich RJ. Perforator Flaps: History, Controversies, Physiology, Anatomy, and Use in Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2009;123(4):132e-145e.
23. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg*. 1987;40(2):113–141.
24. Saint-Cyr M, Wong C, Schaverien M, Mojallal A, Rohrich RJ. The Perforasome Theory: Vascular Anatomy and Clinical Implications. *Plast Reconstr Surg*. 2009;124(5):1529–1544.
25. Taylor GI, Minabe T. The Angiosomes of the Mammals and Other

Vertebrates. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(2):181–215.

26. McGregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. *Br J Plast Surg*. 1973;26(3):202–213.
27. Dhar SC, Taylor GI. The Delay Phenomenon: The Story Unfolds. *Plast Reconstr Surg*. 1999;104(7):2079–2091.
28. Taylor GI, Caddy CM, Watterson PA, Crock JG. The Venous Territories (Venosomes) of the Human Body. *Plast Reconstr Surg*. 1990;86(2):185–213.
29. Hjortdal VE, Hauge E, Hansen ES. Differential Effects of Venous Stasis and Arterial Insufficiency on Tissue Oxygenation in Myocutaneous Island Flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(3):521–529.
30. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial Ischemia in Skin Flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(2):375–385.
31. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(7):1485–1495; discussion 1496-7.
32. Im MJ, Su C-T, Hoopes JE, Anthenelli RM, Hoopes JE. Skin-Flap Metabolism in Rats. *Plast Reconstr Surg*. 1983;71(5):685–688.
33. Epstein FH, McCord JM. Oxygen-Derived Free Radicals in Postischemic Tissue Injury. *N Engl J Med*. 1985;312(3):159–163.
34. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The Role of Oxygen-free Radicals in Ischemic Tissue Injury in Island Skin Flaps. *Ann Surg*. 1983;198(1):87–90.
35. Chang DW, Reece GP, Wang B, et al. Effect of Smoking on Complications in Patients Undergoing Free TRAM Flap Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2000;105(7):2374–2380.
36. Behrends M, Hirose R, Serkova NJ, et al. Mild hypothermia reduces the inflammatory response and hepatic ischemia/reperfusion injury in rats. *Liver Int*. 2006;26(6):734–741.
37. Kato A, Singh S, McLeish KR, Edwards MJ, Lentsch AB. Mechanisms of hypothermic protection against ischemic liver injury in mice. *Am J Physiol Liver Physiol*. 2002;282(4):G608–G616.
38. Mowlavi A, Neumeister MW, Wilhelmi BJ, Song Y-H, Suchy H, Russell RC.

Local Hypothermia during Early Reperfusion Protects Skeletal Muscle from Ischemia-Reperfusion Injury. *Plast Reconstr Surg*. 2003;111(1):242–250.

39. Shaw W, Ko C, Ahn C, Markowitz B. Safe Ischemia Time in Free-Flap Surgery: A Clinical Study of Contact-Surface Cooling. *J Reconstr Microsurg*. 1996;12(07):421–424.
40. Zhang B, Wieslander JB. Dextran's antithrombotic properties in small arteries are not altered by low-molecular-weight heparin or the fibrinolytic inhibitor tranexamic acid: An experimental study. *Microsurgery*. 1993;14(4):289–295.
41. Rothkopf DM, Chu B, Bern S, May JW. The Effect of Dextran on Microvascular Thrombosis in an Experimental Rabbit Model. *Plast Reconstr Surg*. 1993;92(3):511–515.
42. Hein KD, Wechsler ME, Schwartzstein RM, Morris DJ. The adult respiratory distress syndrome after dextran infusion as an antithrombotic agent in free TRAM flap breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 1999;103(6):1706–1708.
43. Ritter E, Cronan J, Rudner A, Serafin D, Klitzman B. Improved Microsurgical Anastomotic Patency with Low Molecular Weight Heparin. *J Reconstr Microsurg*. 1998;14(05):331–336.
44. Soucacos PN, Beris AE, Malizos KN, Kabani CT, Pakos S. The use of medicinal leeches, Hirudo medicinalis, to restore venous circulation in trauma and reconstructive microsurgery. *Int Angiol*. 1994;13(3):251–258.
45. Rohrich RJ, Cherry GW, Spira M. Enhancement of Skin-Flap Survival Using Nitroglycerin Ointment. *Plast Reconstr Surg*. 1984;73(6):943–948.
46. Weksler BB, Pett SB, Alonso D, et al. Differential inhibition by aspirin of vascular and platelet prostaglandin synthesis in atherosclerotic patients. *N Engl J Med*. 1983;308(14):800–805.
47. Peter FW, Franken RJ, Wang WZ, et al. Effect of low dose aspirin on thrombus formation at arterial and venous microanastomoses and on the tissue microcirculation. *Plast Reconstr Surg*. 1997;99(4):1112–1121.
48. Suárez Nieto C, Suárez García MJ, Barthe García P. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg*. 1992;45(2):113–116.

49. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124–1136.
50. Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992;107(4):549–552.
51. Pearl RM. A unifying theory of the delay phenomenon--recovery from the hyperadrenergic state. *Ann Plast Surg*. 1981;7(2):102–112.
52. Hamilton K, Wolfswinkel EM, Weathers WM, et al. The Delay Phenomenon: A Compilation of Knowledge across Specialties. *Craniomaxillofac Trauma Reconstr*. 2014;7(2):112–118.
53. Herlin C, Bekara F, Bertheuil N, et al. Venous Supercharging Reduces Complications and Improves Outcomes of Distally Based Sural Flaps. *J Reconstr Microsurg*. 2017;33(05):343–351.
54. Semple JL. Retrograde Microvascular Augmentation (Turbocharging) of a Single-Pedicle TRAM Flap Through a Deep Inferior Epigastric Arterial and Venous Loop. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(1):109–117.
55. Yii NW, Evans GRD, Miller MJ, et al. Thrombolytic Therapy: *Ann Plast Surg*. 2001;46(6):601–604.
56. Brown J., Devine J., Magennis P, Sillifant P, Rogers S., Vaughan E. Factors that influence the outcome of salvage in free tissue transfer. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2003;41(1):16–20.
57. Holm C, Tegeler J, Mayr M, Becker A, Pfeiffer UJ, Mühlbauer W. Monitoring free flaps using laser-induced fluorescence of indocyanine green: A preliminary experience. *Microsurgery*. 2002;22(7):278–287.
58. Newman MI, Samson MC. The application of laser-assisted indocyanine green fluorescent dye angiography in microsurgical breast reconstruction. *J Reconstr Microsurg*. 2009;25(1):21–26.
59. Jakubietz RG, Schmidt K, Bernuth S, Meffert RH, Jakubietz MG. Evaluation of the Intraoperative Blood Flow of Pedicled Perforator Flaps Using Indocyanine Green-fluorescence Angiography. *Plast Reconstr surgery Glob open*. 2019;7(9):e2462.

60. Krishnan KG, Schackert G, Steinmeier R. The role of near-infrared angiography in the assessment of post-operative venous congestion in random pattern, pedicled island and free flaps. *Br J Plast Surg*. 2005;58(3):330–338.
61. Komorowska-Timek E, Gurtner GC. Intraoperative Perfusion Mapping with Laser-Assisted Indocyanine Green Imaging Can Predict and Prevent Complications in Immediate Breast Reconstruction. *Plast Reconstr Surg*. 2010;125(4):1065–1073.
62. Hallock GG, Altobelli JA. Assessment of TRAM flap perfusion using laser Doppler flowmetry: an adjunct to microvascular augmentation. *Ann Plast Surg*. 1992;29(2):122–127.
63. Jacob MP. Extracellular matrix remodeling and matrix metalloproteinases in the vascular wall during aging and in pathological conditions. *Biomed Pharmacother*. 2003;57(5–6):195–202.
64. Lambert E, Dassé E, Haye B, Petitfrère E. TIMPs as multifacial proteins. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2004;49(3):187–198.
65. Nagase H, Woessner JF. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 1999;274(31):21491–21494.
66. Loffek S, Schilling O, Franzke C-W. Biological role of matrix metalloproteinases: a critical balance. *Eur Respir J*. 2011;38(1):191–208.
67. Visse R, Nagase H. Matrix Metalloproteinases and Tissue Inhibitors of Metalloproteinases. *Circ Res*. 2003;92(8):827–839.
68. Nguyen M, Arkell J, Jackson CJ. Human endothelial gelatinases and angiogenesis. *Int J Biochem Cell Biol*. 2001;33(10):960–970.
69. Ferreras M, Felbor U, Lenhard T, Olsen BR, Delaissé J. Generation and degradation of human endostatin proteins by various proteinases. *FEBS Lett*. 2000;486(3):247–251.
70. Cury V, Moretti AIS, Assis L, et al. Low level laser therapy increases angiogenesis in a model of ischemic skin flap in rats mediated by VEGF, HIF-1α and MMP-2. 2013 August Epub.
71. Creemers EE, Cleutjens JP, Smits JF, Daemen MJ. Matrix metalloproteinase inhibition after myocardial infarction: a new approach to prevent heart failure? *Circ Res*. 2001;89(3):201–210.

72. Dollery CM, McEwan JR, Henney AM. Matrix metalloproteinases and cardiovascular disease. *Circ Res*. 1995;77(5):863–868.
73. Peterson JT. Matrix metalloproteinase inhibitor development and the remodeling of drug discovery. *Heart Fail Rev*. 2004;9(1):63–79.
74. Borkakoti N. Matrix metalloprotease inhibitors: design from structure. *Biochem Soc Trans*. 2004;32(Pt 1):17–20.
75. Vihinen P, Kähäri V-M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. *Int J cancer*. 2002;99(2):157–166.
76. Hoekstra R, Eskens FA, Verweij J. Matrix metalloproteinase inhibitors: current developments and future perspectives. *Oncologist*. 2001;6(5):415–427.
77. Beaudeux J-L, Giral P, Bruckert E, Foglietti M-J, Chapman MJ. Matrix metalloproteinases, inflammation and atherosclerosis: therapeutic perspectives. *Clin Chem Lab Med*. 2004;42(2).
78. Golub LM, Ramamurthy N, McNamara TF, et al. Tetracyclines inhibit tissue collagenase activity. A new mechanism in the treatment of periodontal disease. *J Periodontal Res*. 1984;19(6):651–655.
79. Ryan ME, Usman A, Ramamurthy NS, Golub LM, Greenwald RA. Excessive matrix metalloproteinase activity in diabetes: inhibition by tetracycline analogues with zinc reactivity. *Curr Med Chem*. 2001;8(3):305–316.
80. Nemunaitis J, Poole C, Primrose J, et al. Combined analysis of studies of the effects of the matrix metalloproteinase inhibitor marimastat on serum tumor markers in advanced cancer: selection of a biologically active and tolerable dose for longer-term studies. *Clin Cancer Res*. 1998;4(5):1101–1109.
81. Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi Temel Araştırma, Doku ve Organ Nakli Modelleri. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri; 2005.
82. McFarlane RM, Deyoung G, Henry RA. The Design Of a Pedicle Flap In The Rat To Study Necrosis And Its Prevention. 1965 February Epub.
83. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG. An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(3):408–416; discussion 417-8.
84. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg*. 1987;40(2):113–

141.

85. Mücke T, Fichter AM, Schmidt LH, Mitchell DA, Wolff K-D, Ritschl LM. Indocyanine green videoangiography-assisted prediction of flap necrosis in the rat epigastric flap using the flow ® 800 tool. *Microsurgery*. 2017;37(3):235–242.
86. Nasser A, Fourman M, Gersch R, et al. Utilizing Indocyanine Green Dye Angiography to Detect Simulated Flap Venous Congestion in a Novel Experimental Rat Model. *J Reconstr Microsurg*. 2015;31(08):590–596.
87. Gottlieb LJ, Krieger LM. From the reconstructive ladder to the reconstructive elevator. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(7):1503–1504.
88. Sasaki GH, Pang CY. Hemodynamics and viability of acute neurovascular island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg*. 1980;65(2):152–158.
89. Milton SH. The effects of "delay" on the survival of experimental pedicled skin flaps. *Br J Plast Surg*. 1969;22(3):244–252.
90. Qi Z, Gu Y, Kim D, Hiura A, Sumi S, Inoue K. The effect of fibrin on the survival of ischemic skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg*. 2007;120(5):1148–1155.
91. Emerson DJ, Sykes PJ. The effect of prostacyclin on experimental random pattern flaps in the rat. *Br J Plast Surg.* 1981;34(3):264–266.
92. Lineaweaver WC, Lei M-P, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg*. 2004;239(6):866–873; discussion 873-5.
93. Conway EM, Collen D, Carmeliet P. Molecular mechanisms of blood vessel growth. *Cardiovasc Res*. 2001;49(3):507–521.
94. Botusan IR, Sunkari VG, Savu O, et al. Stabilization of HIF-1alpha is critical to improve wound healing in diabetic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105(49):19426–19431.
95. Fang J, Yan L, Shing Y, Moses MA. HIF-1alpha-mediated up-regulation of vascular endothelial growth factor, independent of basic fibroblast growth factor, is important in the switch to the angiogenic phenotype during early tumorigenesis. *Cancer Res*. 2001;61(15):5731–5735.
96. Stetler-Stevenson WG. Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving

target for therapeutic intervention. *J Clin Invest*. 1999;103(9):1237–1241.

97. Rivilis I, Milkiewicz M, Boyd P, et al. Differential involvement of MMP-2 and VEGF during muscle stretch- versus shear stress-induced angiogenesis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283(4):H1430-8.
98. Gu Z, Kaul M, Yan B, et al. S-nitrosylation of matrix metalloproteinases: signaling pathway to neuronal cell death. *Science*. 2002;297(5584):1186–1190.
99. Paduch R, Walter-Croneck A, Zdzisińska B, Szuster-Ciesielska A, Kandefer-Szerszeń M. Role of reactive oxygen species (ROS), metalloproteinase-2 (MMP-2) and interleukin-6 (IL-6) in direct interactions between tumour cell spheroids and endothelial cell monolayer. *Cell Biol Int*. 2005;29(7):497–505.
100. Lizarbe TR, García-Rama C, Tarín C, et al. Nitric oxide elicits functional MMP-13 protein-tyrosine nitration during wound repair. *FASEB J*. 2008;22(9):3207–3215.
101. Esteves GR, Junior IE, Masson IFB, et al. Photobiomodulation effect in tumoral necrosis factor-alpha(TNF-α) on the viability of random skin flap in rats. *Lasers Med Sci*. 2022;37(3):1495–1501.
102. Hamano Y, Zeisberg M, Sugimoto H, et al. Physiological levels of tumstatin, a fragment of collagen IV α3 chain, are generated by MMP-9 proteolysis and suppress angiogenesis via αVβ3 integrin. *Cancer Cell*. 2003;3(6):589–601.
103. Ulrich D, Lichtenegger F, Unglaub F, Smeets R, Pallua N. Effect of chronic wound exudates and MMP-2/-9 inhibitor on angiogenesis in vitro. *Plast Reconstr Surg*. 2005;116(2):539–545.
104. Zhang F, Fischer K, Komorowska-Timek E, et al. Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg*. 2001;46(3):314–319.
105. Milton SH. Pedicled skin-flaps: the fallacy of the length: width ratio. *Br J Surg*. 1970;57(7):502–508.
106. Daniel RK, Williams HB. The free transfer of skin flaps by microvascular anastomoses. An experimental study and a reappraisal. *Plast Reconstr Surg*. 1973;52(1):16–31.
107. Jensen JA, Handel N, Silverstein MJ, Waisman J, Gierson ED. Extended skin

island delay of the unipedicle TRAM flap: experience in 35 patients. *Plast Reconstr Surg*. 1995;96(6):1341–1345.

108. Callegari PR, Taylor GI, Caddy CM, Minabe T. An anatomic review of the delay phenomenon: I. Experimental studies. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(3):397–407; discussion 417-8.
109. Du Z, Zan T, Li H, Li Q. A study of blood flow dynamics in flap delay using the full-field laser perfusion imager. *Microvasc Res*. 2011;82(3):284–290.
110. Pang CY, Forrest CR, Neligan PC, Lindsay WK. Augmentation of blood flow in delayed random skin flaps in the pig: effect of length of delay period and angiogenesis. *Plast Reconstr Surg*. 1986;78(1):68–74.
111. Arranz López JL, Suárez Nieto C, Barthe García P, Rojo Ortega JM. Evaluation of angiogenesis in delayed skin flaps using a monoclonal antibody for the vascular endothelium. *Br J Plast Surg*. 1995;48(7):479–486.
112. Barthe Garcia P, Suarez Nieto C, Rojo Ortega JM. Morphological changes in the vascularisation of delayed flaps in rabbits. *Br J Plast Surg*. 1991;44(4):285–290.
113. Xie Y, Mustafa A, Yerzhan A, et al. Nuclear matrix metalloproteinases: functions resemble the evolution from the intracellular to the extracellular compartment. 2017 Epub.
114. Jabłońska-Trypuć A, Matejczyk M, Rosochacki S. Matrix metalloproteinases (MMPs), the main extracellular matrix (ECM) enzymes in collagen degradation, as a target for anticancer drugs. *J Enzyme Inhib Med Chem*. 2016;31(sup1):177–183.
115. Goldie JH. Modelling the process of drug resistance. 1994 March Epub.
116. Catts VS, Farnsworth ML, Haber M, Norris MD, Lutze-Mann LH, Lock RB. High level resistance to glucocorticoids, associated with a dysfunctional glucocorticoid receptor, in childhood acute lymphoblastic leukemia cells selected for methotrexate resistance. *Leukemia*. 2001;15(6):929–935.
117. Dong J, Opresko LK, Dempsey PJ, Lauffenburger DA, Coffey RJ, Wiley HS. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(11):6235–6240.

118. Haro H, Crawford HC, Fingleton B, Shinomiya K, Spengler DM, Matrisian LM. Matrix metalloproteinase-7-dependent release of tumor necrosis factor-alpha in a model of herniated disc resorption. *J Clin Invest*. 2000;105(2):143–150.
119. Raza SL, Cornelius LA. Matrix metalloproteinases: pro- and anti-angiogenic activities. *J Investig dermatology Symp Proc*. 2000;5(1):47–54.
120. Crowe PD, Walter BN, Mohler KM, Otten-Evans C, Black RA, Ware CF. A metalloprotease inhibitor blocks shedding of the 80-kD TNF receptor and TNF processing in T lymphocytes. *J Exp Med*. 1995;181(3):1205–1210.
121. Fernandez-Real J-M, Lainez B, Vendrell J, et al. Shedding of TNF-alpha receptors, blood pressure, and insulin sensitivity in type 2 diabetes mellitus. *Am J Physiol Endocrinol Metab*. 2002;282(4):E952-9.
122. Reddy P, Slack JL, Davis R, et al. Functional analysis of the domain structure of tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *J Biol Chem*. 2000;275(19):14608–14614.
123. Madge LA, Sierra-Honigmann MR, Pober JS. Apoptosis-inducing agents cause rapid shedding of tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1). A nonpharmacological explanation for inhibition of TNF-mediated activation. *J Biol Chem*. 1999;274(19):13643–13649.
124. Nyormoi O, Mills L, Bar-Eli M. An MMP-2/MMP-9 inhibitor, 5a, enhances apoptosis induced by ligands of the TNF receptor superfamily in cancer cells. *Cell Death Differ*. 2003;10(5):558–569.
125. Zhang Y, Karki R, Igwe OJ. Toll-like receptor 4 signaling: A common pathway for interactions between prooxidants and extracellular disulfide high mobility group box 1 (HMGB1) protein-coupled activation. *Biochem Pharmacol*. 2015;98(1):132–143.
126. Bai Y, Han Y, Yan X-L, et al. Adipose mesenchymal stem cell-derived exosomes stimulated by hydrogen peroxide enhanced skin flap recovery in ischemia-reperfusion injury. *Biochem Biophys Res Commun*. 2018;500(2):310–317.
127. Plock JA, Tromp AE, Contaldo C, et al. Hemoglobin vesicles reduce hypoxia-related inflammation in critically ischemic hamster flap tissue. *Crit Care Med*.

2007;35(3):899–905.

128. Rao J, Qiu J, Ni M, et al. Macrophage nuclear factor erythroid 2-related factor 2 deficiency promotes innate immune activation by tissue inhibitor of metalloproteinase 3-mediated RhoA/ROCK pathway in the ischemic liver. *Hepatology*. 2022;75(6):1429–1445.
129. Liu B, Xu Q, Wang J, et al. Recombinant human growth hormone treatment of mice suppresses inflammation and apoptosis caused by skin flap ischemia–reperfusion injury. *J Cell Biochem*. 2019;120(10):18162–18171.
130. Jiang J, Dong C, Zhai L, et al. Paeoniflorin Suppresses TBHP-Induced Oxidative Stress and Apoptosis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells via the Nrf2/HO-1 Signaling Pathway and Improves Skin Flap Survival. 2021 November 4 Epub.
131. Habibi Z, Hoormand M, Banimohammad M, et al. The Novel Role of Crocus sativus L. in Enhancing Skin Flap Survival by Affecting Apoptosis Independent of mTOR: A Data-Virtualized Study. *Aesthetic Plast Surg*. 2022;46(6):3047–3062.
132. Li J, Bao G, ALyafeai E, et al. Betulinic Acid Enhances the Viability of Random-Pattern Skin Flaps by Activating Autophagy. 2019 September 13 Epub.
133. Rabello FB, Souza CD, Júnior JAF. Update on hypertrophic scar treatment. *Clinics*. 2014;69(8):565–573.
134. Nischwitz SP, Rauch K, Luze H, et al. Evidence-based therapy in hypertrophic scars: An update of a systematic review. *Wound Repair Regen*. 2020;28(5):656–665.
135. Limandjaja GC, Niessen FB, Scheper RJ, Gibbs S. Hypertrophic scars and keloids: Overview of the evidence and practical guide for differentiating between these abnormal scars. *Exp Dermatol*. 2021;30(1):146–161.
136. Keskin ES, Keskin ER, Öztürk MB, Çakan D. The Effect of MMP-1 on Wound Healing and Scar Formation. *Aesthetic Plast Surg*. 2021;45(6):2973–2979.