TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

SIÇANLARDA DORSAL RANDOM PATERNLİ FLEPLERDE SİSTEMİK OLARAK VERİLEN ‘‘DİMETİLOKSALİLGLİSİN’’İN YAŞAYABİLİRLİK ÜZERİNE ETKİSİNİN ARAŞTIRILMASI (DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Volkan Serdar OTRAKÇI

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ

DANIŞMAN
Prof. Dr. Kutlu SEVİN

ANKARA
2012

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan "Sıçanlarda Dorsal Random Paternli Fleplerde Sistemik Olarak Verilen "Dimetiloksalilglisin" in Yaşayabilirlik Üzerine Etkisinin Araştırılması" başlıklı Dr. Volkan Serdar Otrakçı'ya ait bu çalışma jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 24.04.2012

Prof. Dr. Kutlu Sevin
A.Ü.T.F Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
Tez Danışmanı - Jüri Başkanı

Prof. Dr. Mustafa Özbek
A.Ü.T.F Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
(Jüri Üyesi)

Prof. Dr. Serdar M.Gültan
A.Ü.T.F Plastik Rekonstrüktif ve
Estetik Cerrahi Anabilim Dalı
(Jüri Üyesi)

ÖNSÖZ

Büyük umutlarla başladığım 6 yıllık uzun ve zorluklarla dolu, ama bir o kadar da heyecan duyup keyif aldığım Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi ihtisasım süresince hekimlik bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyerek en iyi şekilde yetişmemi sağlayan saygıdeğer hocalarım Prof. Dr. Erdem Yormuk, Prof. Dr. Serdar Gültan, Prof. Dr. Mustafa Özbek, Prof. Dr. Kutlu Sevin, Prof. Dr. Murat Emiroğlu, Prof. Dr. Zeki Can ve Doç. Dr. Savaş Serel'e çok teşekkür ederim ve her zaman minnetkar kalacağımı belirtmek isterim.

Maddi ve manevi olarak bu seviyeye gelmemde çok büyük emeği olan aileme teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım ve zorluklarla dolu asistanlık eğitimini kolaylaştıran asistan arkadaşlarım, hemşireler ve personele teşekkür ederim.

Ayrıca bu tezin oluşmasında büyük yardım ve emeği olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Hakan Ergün ve asistanı Dr. Erol Rauf Ağış'a, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Histoloji-Embryoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Prof. Dr. Belgin Can'a ve asistanı Dr. Hilal Göktürk'e ve de Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyoistatistik Anabilim Dalı öğretim üyesi Yrd. Doç. Dr. Kenan Köse'ye teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay Sayfası **ii**

Önsöz **iii**

İçindekiler **iv**

Kısaltmalar Dizini **vi**

Şekiller Dizini **vii**

Tablolar Dizini **ix**

1. GİRİŞ **1**

2. GENEL BİLGİLER **2**

2.1. Flep Fizyolojisi 2

2.2 Anjiogenez 3

2.3. Sıçan Dorsal Yarımada Flebi 6

2.4. Dimetiloksalilglisin ve Etki Mekanizması 7

3. GEREÇ ve YÖNTEM **10**

3.1. Deney Hayvanları 10

3.2. Gereçler 10

3.3. Yöntem 12

3.3.1. Çalışma Grupları 12

3.3.2. Cerrahi Teknik 12

3.4. Değerlendirme Yöntemleri 15

3.4.1. Genel Değerlendirme 15

3.4.2. Flep Nekroz Alanı 16

3.4.3. Lazer Doppler Akım Ölçer 17

3.4.4. Histopatolojik Değerlendirme 17

3.4.5. İstatistiksel Değerlendirme 19

4. BULGULAR **20**

4.1. Genel Bulgular 20

4.2. Laser Doppler Akım Ölçer Bulguları 20

4.3. Flep Nekroz Alanı Bulguları 21
4.4. Histopatolojik Bulgular 23
5. TARTIŞMA **30**
6. SONUÇLAR **36**
ÖZET **37**
SUMMARY **38**
KAYNAKLAR **39**

KISALTMALAR DİZİNİ

CD31 : PECAM-1; trombosit endotelyal adhezyon molekülü
DMOG : Dimetiloksalilglisin
DNA : Deoksiribonükleik asit
eNOS : Endotelyal nitrik oksit sentetaz
EPO : Eritropoetin
FGF : Fibroblast büyüme faktörü
G- CSF : Granülosit koloni uyarıcı faktörü
GLUT1 : Glukoz taşiyıcı gen -1
H-E : Hematoksilen Eozin boyaları
HIF : Hipoksi ile uyarılmış protein kompleksi
HGF : Hepatosit büyüme faktörü
IL : İnterlökin
iNOS : İndüklenebilir nitrik oksit sentetaz
M-A : Mallory Azan boyaları
MAPK : Mitojen ile aktive olmuş protein kinaz
MMP : Matriks metalloproteinazları
mRNA : Elçi ribonükleik asit
PDGF : Trombosit kaynaklı büyüme faktörü
PMNL : Polimorfonükleer lökosit
PI3K : Fosfotidilinositol 3-kinaz
PlGF : Plasental büyüme faktörü
TGF-α : Transforme edici büyüme faktörü – alfa
TNF-α : Doku nekroz faktörü
TRAM : Transvers rektus abdominis flebi
VEGF : Vasküler endotelyal büyüme faktörü
VEGFR1 : Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü - 1
VHL : Von Hippel-Lindau

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 3.1: -20 santigrat derecede muhafaza edilerek saklanmış DMOG. 11
Şekil 3.2: Sıçanın preoperatif hazırlanması, flebin planması, sütüre edilecek ve lazer Doppler ile ölçüm yapılacak flep 1/3 proksimal noktalarının işaretlenmesi. 13
Şekil 3.3: Operasyon öncesi flep 1/3 proksimal kısmına yerleştirilen lazer Doppler probu ile kan akımı ölçümü. 14
Şekil 3.4: Planlamaya uygun olarak kaldırılmış dorsal random paternli yarımada flebi. 14
Şekil 3.5: Flep kaldırıldıktan hemen sonra flebin yerine 4/0 sütürlerle iade edilmesi ve aynı noktadan lazer Doppler kaydı alınması. 15
Şekil 3.6: Kontrol grubundan bir sıçanın flebinin postoperatif 7. gün görünümü. 15
Şekil 3.7: Operasyon sonrası 7. günde gelişen nekroz ve nekroz yüzdesinin planimetrik olarak hesaplanması. 16
Şekil 3.8: Lazer Doppler akım ölçer. 17
Şekil 4.1: Kontrol grubundaki sıçanların postoperatif 7. gündeki görünümleri. 22
Şekil 4.2: DMOG verilmiş gruptaki sıçanların fleplerinin postoperatif 7. gün görünümü. 23
Şekil 4.3: A: Kontrol grubu yara yerini gösteren kesit. Kıvrımlı ok: PMNL infiltrasyonu. Yıldız: Papiller dermis ve retiküler dermisteki ödemli kollajen. Sivri ok: Epitelizasyon bölgesi. f: Fibroblast. Boya: H-E, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubu sağlam bölge-yara yeri geçiş bölgesi. Kıvrımlı ok: PMNL infiltrasyonu. Yıldız: Papiller dermis ve retiküler dermisteki ödemli kollajen. Sivri ok: Epitelizasyon bölgesi. f: Fibroblast. E: Sağlam bölge epidermis katı, Boya: H-E, x40 büyütme Bar: 0,5 µm. 26
Şekil 4.4: A: Kontrol grubu papiller ve retiküler dermiste ödem, kollajen lifleri arası ayrılmalar. Kıvrımlı ok: PMNL infiltrasyonu. Yıldız: Ödemli kollajen. Boya: H-E, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubu iyileşme bölgesi, PMNL'lerin sınırlı alanda olduğu ve ödemin papiller dermis alanıyla sınırlı olduğu gözlenmekte. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Karo: Normal kollajen lifleri. f: Fibroblast. Boya: H-E, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm 27
Şekil 4.5: A: Kontrol grubu yara yeri PMNL ve lenfosit infiltrasyonu. n: Nötrofil. f: Fibroblast. İnce ok: Lenfosit. Boya: H-E, x100 büyütme. Bar: 0,25 µm. B: Deney grubu inflamasyon bölgesi hücreleri. Fibroblastların ağırlıklı olduğu gözlenmektedir. F: Fibroblast, n: nötrofil. Yıldız: Papiller dermiste ödem. Sivri ok: Epitelizasyon gösteren hücreler. Boya: H-E. x100 büyütme. Bar: 0,25 µm. 27
Şekil 4.6: Deney grubu bağ dokusu hücreleri. Yeni oluşan kollajen lifleri arasında çok sayıda düzgün sınırlı ve belirgin çekirdekli fibroblast benzeri hücre izlenmiştir. p: Plazmosit. n: nötrofil. f: Fibroblast. Boya: H-E, x100 büyütme. Bar: 0,25 µm. 28

Şekil 4.7: A: Kontrol grubu yara yeri altında damar dışı (ekstravaze) eritrosit yoğunluğu göze çarpmakta. Yıldız: Ödemli granulasyon dokusu. Karo: Normal kollajen lifleri. Ok başı: Ekstravaze eritrositler. Boya: M-A, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubunda yeni oluşan ve varolan damarların yoğun görünümü dikkat çekmekteydi. Ok: Vasküler yapılar. Boya: M-A. x10 büyütme. Bar: 2 µm. 28

Şekil 4.8: A: Kontrol grubunda papiller ve retiküler dermiste kollajen liflerinde ödem geniş bir alanı kapsamaktaydı. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Karo: Normal kollajen lifleri. Boya: H-E, x10 büyütme. Bar: 2 µm. B: Deney grubunda ödem genellikle yara yerinde papiller dermis bölgesi ile sınırlıydı, diğer alanlardaki kollajen lifleri ve kas yapıları normal görünümdeydi. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Karo: Normal kollajen lifleri. Boya: H-E. x4 büyütme. Bar: 2 µm. 29

Şekil 4.9: A: Kontrol grubu ödemli kollajen ve PMNL infiltrasyonu, ödemli kollajen lifleri arasında ayrılmalar mevcut. Kıvrımlı ok: PMNL ve lenfosit infiltrasyonu. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Kuyruklu ok: Epitelizasyon bölgeleri. Boya: H-E. x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubu sınırlı inflamasyon ve ödem bölgesi, ödemli bölgenin papiller dermisle sınırlı olması dikkat çekici. Karo: normal kollajen lifleri. Sivri ok: Epitelizasyon bölgesi. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Boya: H-E. x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. 29

TABLOLAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Histolojik değerlendirme parametrelerinin skorlanması. 18

Tablo 4.1: Kontrol grubunda PMNL infiltrasyonu, papiller ve retiküler dermiste ödem ve ekstravaze eritrosit parametrelerinin skorlanması. 25

Tablo 4.2: Deney grubunda PMNL infiltrasyonu, papiller ve retiküler dermiste ödem ve ekstravaze eritrosit parametrelerinin skorlanması. 25

Tablo 4.3: Damar yoğunluklarının hesaplanması. 26

1. GİRİŞ

Flep, kan dolaşımı korunarak alıcı alandan verici alana aktarılabilen doku birimidir. Plastik rekonstrüktif ve estetik cerrahide cilt defektlerinin onarımı için cilt flepleri oldukça sık kullanılmaktadır. Ancak flebin dolaşımının daha zayıf oldugu distal parçasında iskemiye baglı oluşan nekroz, defekt onarımında gecikmelere neden olmakta ve sekonder girişimlere gereksinim doğurmaktadır. Bu yüzden, bir flebin yaşayan uzunluğunun artırılması veya flepteki nekroz miktarının azaltılması, plastik rekonstrüktif ve estetik cerrahinin başlıca araştırma konuları arasına girmiştir. Fleplerin beslenme paternlerinin anlaşılması ile birlikte çalışmalar flep yaşayabilirligini artıracak yöntemleri bulmaya yönelmiştir.

Flep sağkalımı, flep içi damar yapılanmasına bağlıdır. Flep içi damarsal yapılanma ve vaskuler fizyoloji flep cerrahisinde başarı ve kaybı belirler. Deri flepleri her ne kadar daha az kan akımına sahip olsalar da, metabolik ihtiyaçları kaslara oranla daha azdır ve iskemi periyotlarına kaslardan daha toleranslıdır. Birçok farmakolojik ajanın flep yaşayabilirligi ve perfüzyonunun düzelmesine yönelik farklı etkinlik gösterdigi bildirilmektedir. Çoğu deneysel olarak etkili bulunsa da, öngörülebilir klinik etkileri hala gösterilememiştir.

DMOG (dimetiloksalilglisin), HİF-1 (hipoksi ile uyarılmış protein kompleksi) vasıtasıyla VEGF (vasküler endotelyal büyüme faktörü) transkripsiyonunu artırır. Birçok modelde VEGF ile flep yaşayabilirliğinin arttırıldığı gösterilmiştir.

Bu çalışmada, sistemik olarak verilen dimetiloksalilglisinin sıçan sırt yarımada fleplerinde flep yaşayabilirliğine olan etkisi incelenecektir. Böylece bu çalışma ileride flep cerrahisi geçirmiş hastalarda olası flep beslenme bozukluklarında dimetiloksalilglisinin kullanılabilirliği için ön çalışma niteliği taşıyacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1 Flep Fizyolojisi

Kelime olarak flep, "flappe" den köken alır ve kanat şeklinde bir kenarından bağlı serbest parça anlamına gelmektedir. Flemenkçe'de ise "flap" yelken anlamına gelmektedir. Klasik tanımla, beslenmesi orjinal yerinde korunarak vücudun başka bir bölgesine aktarılan dokulara flep adı verilmektedir.

Bir flebin canlılığını sağlayan kendisine ait bir beslenme kaynağı bulunmaktadır. Bu kaynak, form ve fonksiyonun yeniden sağlanmasında fleplere büyük bir avantaj tanır. Bir flebin canlılığı kendi dolaşımına bağlı olduğundan, flebin vasküler fizyolojisinin tamamıyla anlaşılıp optimize edilebilmesi, başarı ile başarısızlık arasındaki farkı yaratır.

Fleplerde kanlanma, birbirine bağlı makrodolaşım ve mikrodolaşım olmak üzere iki ana sistemden oluşur. Bu kaynaklar sistemik veya çevresel faktörlerden etkilenebilir ve bu etkilenimler perfüzyonu ve dolayısıyla canlılığı da dramatik olarak etkileyebilirler. Bir flebin planlamasında makrodolaşım anatomisi esas alınır. Flebin makrodolaşımı, flebin bütünündeki hücresel metabolizmanın temelini oluşturan besinlerin ve oksijenin taşınması ve karbondioksit ve atıkların uzaklaştırılmasına yarayan mikrodolaşım yatağını meydana getirir. Kanlanma ve perfüzyon kontrolünün büyük bir kısmı arteriol, kapiller, venül ve arteriovenöz anastomozlardan oluşan mikrodolaşım düzeyinde meydana gelmektedir. Tüm bunlara ek olarak derinin dolayısıyla planlanan fleplerin kanlanma paterni, sadece deri değil tüm dokulardan kaynaklı 3 boyutlu bir damarsal ağdan oluşmaktadır (1).

Deri kan akımının ana kontrol merkezi arterioler seviyedir. Sempatik etki, prekapiller sfinkter, arteriyol ve arteriyovenöz anastomozlarda kan akımını düzenleyici etkiye sahiptir. Sempatik etki, kanın arteriyovenöz anastomoza yönelerek kapiller yatağa giden kan miktarında azalmaya yol açar (2, 3).

Derinin kanlanmasında; mikrodolaşımdaki endotel, trombosit ve lökosit gibi hücreler de rol alır. Endotel hücreleri, vazoaktif maddeler salarak ve dolaşımdaki

lökosit ve trombositlerle etkileşime girerek kan akımının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır (4).

Kan basıncı, derinin beslenmesinde tüm dokularda olduğu gibi önemli bir faktördür. Flep yaşamı, kan akımı ile metabolik ihtiyaç arasındaki kritik dengeye dayanmaktadır. Deri kan akımı, lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede kontrol edilmektedir. Sistemik kontrol; nöral ve hormonal olabilmektedir. Lokal düzeyde vazodilatasyona yol açan hiperkapni, hipoksi ve asidoz gibi metabolik faktörler, deri kan akımını etkilemektedir. Artmış doku perfüzyonu ve hipotermi ise lokal olarak vazokonstrüksiyon ile kan akımını azaltmaktadırlar (5, 6).

Flep kaldırılırken, kütanöz damarlar ve sempatik sinirlerin uçları hasarlanmaktadır. Akut olarak kaldırılan flepte akım oranı düşmektedir. Distale doğru akım düşerken iskemi artmaktadır. Flep kaldırıldıktan sonra distal kısımdaki lokal iskemi, azami vazodilatasyona yol açar. Proksimal kısımdaki yetersiz perfüzyon basıncı flebin distalinde arteryel yetersizlik ve bunun sonucunda flebin kaybına neden olur (2, 8). Pediküllü fleplerde gelişen nekrozun primer nedenlerinin başında arteryel giriş yetersizliği gelir. Ayrıca yetersiz venöz dönüş de flep kaybına sık sebep olan diğer bir faktördür. Hatalı flep planlaması, iskemi-reperfüzyon hasarı, mikrodolaşımı bozan sistemik faktörler (sepsis, hipotansiyon, sigara, vazokonstrüktör ilaç kullanımı gibi) ve flebin fiziksel basıları (gerginlik, hematom, yanlış yerleştirilme, pedikülün dönmesi gibi) flep kayıplarına neden olabilen diğer faktörlerdir. Belirli bir süre yeterli besin desteği sağlanamazsa flep hasar geri dönüşümsüz hale gelir (9).

2.2 Anjiogenez

Dokuların büyüyüp varlıklarını korumalarında, yeterli damarlanmanın oluşturulup korunması önemli bir yere sahiptir. Vaskülogenez ve anjiogenez olmak üzere iki farklı damar oluşum mekanizması mevcuttur ve farkları ortaya konmalıdır. Vaskülogenez, ilkel mezenkimal hücrelerin farklılaşarak embryoda kan damarlarının endotelini oluşturmasıdır. Anjiogenez mevcut damarların tomurcuklanarak avasküler dokulara doğru uzamasını ifade eder. Vaskülogenez erken embriyogenez safhasında

meydana gelirken anjiogenez embriyo büyümesinde ve hayatın geri kalanında yeni damarların oluşmasından sorumludur.

Yeni kapillerlerin ve damarların oluşumu, etraflarındaki mezenkimal dokuyla birlikte olmaktadır. Bu oluşum; mekanik, hümoral mekanizmalar ve büyüme faktörleriyle kontrol edilmektedir.

Tüm vucuttaki kontrol mekanizmaları gibi herhangi bir uyarı ortaya çıkana kadar anjiogenez mekanizmaları da hazır bir şekilde kontrollü olarak beklemede olmalıdır. Kapiller büyümenin olmadığı durumlarda mikrovasküler sistem oldukça kararlıdır. Doku hasarı sonucu olan veya dişi üreme organlarındaki periyodik değişiklikler sonucu gelişen anjiogenez dışında erişkin bireylerde endotel hücrelerinin döngüsü oldukça yavaştır. Endotelin aktivasyonu negatif ve pozitif mediatörlerin etkisi altında dengededir. Anjiogenez yara iyileşmesi, enflamasyon ve üreme gibi birçok fizyolojik olayda rol oynar.

Anjiogenez, endotel hücrelerinin çevrelerindeki damar dışı bölgelere göç etmesiyle başlar. Bu hücreler çoğalmaya başlarlar, kapiller güdükler oluştururlar ve bu güdükler komşu damarlarla birleşerek kan akımını sağlarlar (10). Endotel hücrelerinin göçü, mevcut kapillerlerin bazal membranlarındaki değişiklikler ve damar dışında fibrin birikimiyle birlikte olmaktadır. Matriks proteolizi ve kemotaksis sayesinde endotelyal hücreler göç edip çoğalırlar ve yeni kapillerler oluştururlar. Büyüme ilerledikçe genişleyen kapillerler, perisitler ve kasılabilir düz kas hücreleriyle sarılırlar ki buna ağaç büyümesine benzerliği nedeniyle kabuklanma denir. Bu yeni damarlar arteriyollerin histolojik özelliklerine sahiptirler.

Egzersiz, soğuğa maruziyet, türbülan kan akımı, duvar gerilimi, kapiller duvar tansiyonu, periferal dirençteki değişiklikler, kapiller basınç, damar çapı ve eritrosit hızı gibi fiziksel faktörlerin anjiogenezi etkiledikleri gösterilmiştir. Bu kuvvetler in vitro olarak detayıyla çalışılmış ve hücre iskeletini ve ekstrasellüler matriksi değiştirerek hücre göçüne neden oldukları düşünülmüştür.

Anjiogenik büyüme faktörleri lokal olarak sekrete olan proteinlerdir ve embriyogenez, tümör büyümesi, yara iyileşmesi ve damar büyümesinin düzenlenmesinde kilit rol oynarlar. Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF), fibroblast büyüme faktörü (FGF), hepatosit büyüme faktörü (HGF), TGF-α, trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF), interlökinler (IL-1, IL-6, IL-12),

interferonlar, granülosit koloni uyarıcı faktörü (G-CSF), plasental büyüme faktörü (PlGF), proliferin ve proliferin ilişkili proteinler gibi büyüme faktörleri (11) anjiogenezi uyararak iskemik hasara uğramış olan deri fleplerinde fonksiyonel mikrodolaşımın gelişimine etki edebilirler (12, 13, 14,).

Anjiogenez mekanizmalarının uyarılmasında en önemli mediatörler VEGF ve FGF'dir. Bu faktörlerin in vitro olarak çoğalma, göç, ekstrasellüler proteolitik aktivite ve tüp oluşumu gibi endotelyal hücresel işlevleri uyardıklarının bulunması, bu faktörlerin hücre zarında reseptörleri olan doğrudan etkili regülatörler olduklarını düşündürmektedir (15). VEGF'nin gelişimsel ve neoplastik anjiogenezdeki rolü kesin olarak ortaya konmuş olmasına rağmen FGF'nin in vivo yeni damar oluşumu üzerine doğrudan etki ettiği konusunda şüpheler mevcuttur. İn vitro olarak pek çok ajanın etkili olduğunun gösterilmiş olması bunların organizmada kontrol rolü üstlendikleri anlamına gelmemelidir. Endotelyal aktivasyon fazında aktif rol oynayan moleküller arasında vaskülojenik veya anjiojenik faktör olarak anılmayı sağlayacak kriterleri karşılayan en önemli faktör VEGF'dir. VEGF; anjiojenik, mitojenik ve vasküler geçirgenliği artıran bir proteindir ve endotel hücrelerinde nitrik oksit sentazı uyarma yoluyla vazodilatasyona neden olduğu ve aynı zamanda hücre göçünü uyarıp, apoptozisi inhibe ettiği belirtilmiştir (16). Egzersizin VEGF mRNA (elçi ribonükleik asit) sentezini arttırarak anjiogenezi uyardığı gösterilmiştir (17).

VEGF ve FGF gibi doğrudan etkili büyüme faktörlerinin aksine TGF-ß ve doku nekroz faktörü alfa (TNF-α)'nın in vitro (18) olarak endotelyal büyümeyi inhibe etikleri gösterilmiştir ve doğrudan etkili negatif düzenleyiciler oldukları düşünülmektedir. Fakat in vivo çalışmalar bu faktörlerin doğrudan etkili anjiojenik mediatörlerin stromal hücrelerden ve bölgedeki enflamatuar hücrelerden salınımına yol açarak anjiogenezi arttırdığını göstermektedir (19).

Birçok büyüme faktörünün tanımlanması ve mekanizmalarının anlaşılması, fleplerin damarlanması ve canlılığını iyileştiren potansiyel başka yöntemler geliştirilmesini sağlamıştır. Bulgular neovaskularizasyonun anjiogenik faktörler aracılığıyla olduğunu önermektedir. Yapılan deneysel çalısmalarda VEGF ve FGF'nin flep distalinde perfüzyonu iyileştirdiği ve nekrozu önlediği gösterilmiştir (20, 21, 22). Anjiogenez ve hastalıkları üzerine moleküler ve genetik seviyede daha pek çok çalışma yürütülmeye devam etmektedir.

2.3 Sıçan Dorsal Yarımada Flebi

Düşük maliyetle büyük çaplı çalışmalar yapılabilmesi yüzünden sıçan, deri flebi araştırmalarının en sık yapıldığı denektir. Fakat sıçanlarda bu çalışmalarda karşılaşılan en büyük problem, flebin hayvanın kendisi tarafından yenmesidir. Sırt bölgesinde planlanmış fleplerde ise bu risk en azdır (23).

Sıçan sırtında hazırlanan flep modeli ilk olarak 1965 yılında Robert McFarlane ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (24). McFarlane ve arkadaşlarının tanımladığı flepte, her iki skapula ve posterior iliyak çıkıntılar işaretlenip, flep bu noktalar arasında planlanmıştı. Bu nedenle flebin boyutları hayvanın büyüklüğüne göre de farklı olabilmekteydi. Sabit anatomik noktaların referans alınması hayvan büyüklüğünden bağımsız olarak flebin hep aynı damarlardan beslenmesini sağladığı için bir üstünlük olarak ileri sürülmüş olmasına karşın nekroz alanları hep aynı büyüklükte olmuyordu. McFarlane ve arkadaşlarının bu tanıma uygun olarak hazırladıkları fleplerin distalinde hemen her zaman bulunan nekroz alanları tüm flep alanının %22'si ile %50'si arasında değişen büyüklüklerdeydi. Myers ve Cherry'nin benzer bir çalışmasında ise nekroz oranları %23 ile %52 arasında bildirilmişti (25). Bu kadar büyük nekroz yüzdesi aralıkları olması, istatistiksel olarak tutarlı sonuç elde etmek için çok sayıda hayvanla deney gruplarının oluşturulmasını gerektiriyordu. Roger, Khouri ve arkadaşları sırttaki yarımada fleplerinde tutarlı nekroz oranı sağlayıp modeli standardize etmek için eni 3 ve 4 cm olan iki farklı yarımada flep tasarımını kaudal ve kraniyal tabanlı olarak kullandılar. Yaptıkları çalışmada en tutarlı nekroz oranı kaudal ve kraniyal tabanlı hazırlanan 3 cm enindeki fleplerde ortaya çıktı (26, 27). Nekroz oranının büyük varyasyonlar göstermemesi daha az sayıda hayvan kullanarak tutarlı istatistiksel sonuç almayı sağlayacağı için kaudal veya kraniyal tabanlı 'dar' flepler avantajlı kabul edildi. Eni 3, boyu 9 cm'lik kaudal ve kraniyal tabanlı fleplerin daha tutarlı sonuçlar verdiği ve deney gruplarında daha az hayvanla istatistiksel olarak anlamlı sonuçların alınabildiği düşünülmektedir (23).

Flep kaldırılırken, flep kenarları deri altındaki pannikulus karnosus kası flebe dahil edilecek şekilde derin kas fasyası üzerine kadar kesilir. Deri ve altındaki

pannikulus karnosus kasından oluşan flep, kas üzerindeki planda kolayca ilerlenerek kaldırılır. Flep kaldırıldıktan sonra yine aynı yere dikilir ve araştırma protokolü çerçevesinde izlenir. Deri flebi çalışmalarında sonuçları etkileyebilecek dış faktörlere dikkat etmek gerekir. Laboratuarlarda çevresel koşullar ve ortam ısısı kontrollü ve sabit olmalıdır.

2.4 Dimetiloksalilglisin ve Etki Mekanizması

Normal hemostazın sağlanması için doku oksijenasyonu büyük önem taşımaktadır. Bu görev ancak solunum, dolaşım ve hematopoetik sistemlerin ortak uyumlu çalışması ile başarılabilmektedir. Bazen hızlı büyüyen ve yenilenen dokulara oksijeni ve besin kaynaklarını hızlı şekilde ulaştırmak ve atıkları uzaklaştrmak için o bölgede yeni damar oluşumuna ihtiyaç duyulmaktadır. Anjiogenezin cilt flebi canlılığı üzerine olumlu etkileri olduğu, bazı maddelerin veya büyüme faktörlerinin, anjiogenezi artırarak cilt flebi canlılığını artırdıkları daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (28, 29).

Anjiogenezi aktive eden ve baskılayan yapılar organizmada bir denge ve uyum içinde çalışırlar (30, 31). VEGF, vasküler geçirgenlikte değişikliğe ve anjiogeneze yol açarak mikrosirkülasyon üzerinde akut bir etkiye sahiptir (32). Araştırmalar VEGF sentezinin HIF-1 yolağındaki proteinlerin, VEGF-A geninin çoğaltıcı sekansına bağlanmasıyla uyarıldığını göstermektedir. Çevre dokudan salgılanan VEGF bu bölgedeki endotel hücreleri aktive ederek damarlanmayı arttırır. HIF-1 yolağının etkisi sadece VEGF promotörüne değil, burada rolü olan birçok faktör üzerinedir. Yeni damar oluşumu gerçekleşip oksijen konsantrasyonu arttığında HIF-1 aktivitesi azalır ve VEGF üretimi azalır (33).

HIF-1 sistemi, alfa (HIF–1α) ve beta (HIF–1β) olmak üzere 2 alt üniteden oluşur. HIF-1 alfa, hipoksinin yol açtıgı hücresel yanıtlarda rol alan 100'den fazla enzim ve proteinin transkripsiyonunu saglayan ve hipoksi ile indüklenen bir transkripsiyon faktörüdür. HIF-1 alfa, normal oksijen konsantrasyonlu hücrelerde saptanmaz iken, hipoksik koşullar tarafından hızlıca aktive edilir. HIF-1 alfa, HIF-1'in oksijen duyarlı uyarılabilen alt ünitesini oluştururken, HIF-1 beta, HIF-1'i esaslı olarak eksprese eden alt ünitesini oluşturur (34, 35). Hipoksik koşullarda, HIF-1 alfa,

hücre sağkalımı ile ilgili birçok genin transkripsiyonunu aktive eder (36). HIF-1 alfa proteinin yıkılması, E3 ubiquitin-protein ligazlar yoluyla ubiquitilasyonda proteinleri hedef alan oksijen bağımlı prolil hidroksilasyonu tarafından kontrol edilir. Bu ligazlar, hidroksile HIF-1 alfa'ya spesifik bağlanan von Hippel-Lindau (VHL) tümör süpressör proteini içerirler. Ubiquitilasyonlu HIF-1 alfa hızlıca proteozomlar tarafından yıkılır. Hipoksik ortamda, bu E3 ubiquitin-protein ligazlar yolu ile ubiquitilasyon gerçekleşmez ve VHL aracılı ubiquitinasyon oluşmaz. HIF–1α heterodimerizasyonu oluşur ve bu oluşum, DNA üzerindeki yanıt genlerini harekete geçirecek transkripsiyonu başlatır ve anjiogenez yolakları uyarılır (37, 38, 39, 40). Dahası hipoksi ile stabilize olan HIF–1 alfa mono/heterodimerleri, endotelinlerin ve matriks metalloproteinazlarının (MMP) aktifleşmesinde doğrudan rol alırlar.

HIF-1 alfa proteinin sentezi, mitojen ile aktive olmuş protein kinaz (MAPK) ve fosfotidilinositol 3-kinaz (PI3K) ileti yolaklarının aktivasyonu gibi oksijen bağımsız yollar ile düzenlenir (41). Bu yollar, G-protein çift reseptörler veya tirozin kinaz reseptörleri aracılığı ile oluşan sinyal iletileri tarafından aktive edilebilir.

Anjiogenez oluşumunu baskılayan yapıların en önemlileri trombospandin, anjiostatin, endostatindir. Tümör tedavisinde, tümör kan akımının anti-anjiogenez ile azaltılması sonucu tümör hücreleri kronik hipoksiye karşı dirençli hale gelmektedir (42). Bu durumda, hipoksi ile uyarılabilen sinyal yolağının, kronik hipoksiye karşı edinilmiş toleransı geliştirdiği bulunmuştur. Bunu kontrol eden (apopitozisi etkileyerek ve VEGF gen regülasyonunu düzenleyerek) HIF-1 alfa'dır (43, 44). HIF-1 alfa aşırı ekspresyonu, insanlarda birçok kanser tipinde saptanır. Ayrıca birçok güncel çalışma, HIF-1 alfa'nın kemoterapi ve radyoterapiye direnç gözlenmesinde de rol aldığını bildirdiler (45, 46, 47). Bu bulgular, HIF-1 alfa'nın kanser progresyonunda bir role sahip olabilecegini düşündürmektedir. Karsinojenik süreçlerde çeşitli şekillerde rol oynayan büyüme faktörleri, nitrik oksit ve hormonlar bir şekilde HIF–1 alfa'nın stabilize edilmesine yardımcı olurlar.

Normal oksijen konsantrasyonlarında oksijene duyarlı olan HIF-1 alfa prolil hidroksilaz enzimi, proanjiogenik bir faktör olan HIF-1 alfa'nın spesifik prolin artığını hidroksile ederek parçalamaktadır (48). Hücre zarını geçebilen DMOG, HIF-1 alfa prolil hidroksilaz enziminin kompetitif inhibitörü olan bir ajandır ve HIF bağımlı genlerin indüksiyonundan sorumludur (49, 50, 51, 52). Normal oksijen

konsantrasyonlarında 0,1 ila 1 mMol konsantrasyon aralığında kültüre edilmiş hücrelerde HIF-1 alfa ekspresyonunu stabilize etmektedir. Dolayısıyla DMOG, prolil hidroksilaz enzimi inhibisyonu ile HIF-1 alfa aktivitesini artırmaktadır (53). İskemik kalp ve kas hastalıkları ile inflamatuar bağırsak hastalıkları modelleri oluşturulmuş çalışmalarda proinflamatuar mediatörleri artırdığı gösterilmiştir (54). Oksagultarat metabolizması göz önüne alındığında, milimolar doz aralıklarında dahi DMOG toksisitesine rastlanmamıştır.

Bu bilgiler ışığında DMOG, HIF-1 alfa sistemi aracılığıyla etki eden proanjiogenik bir ajan olarak kabul edilmektedir (55, 56). Flep cerrahisinde yeni damar oluşumunun önemi düşünüldüğünde DMOG flep kanlanmasının artırılmasına yardımcı olabilecek bir ajan olarak düşünülmelidir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel tez çalışması için Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 07.09.2011 tarih ve 2011-119-467 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Histoloji-Emriyoloji Anabilim Dalı ve Klinik Farmakoloji Anabilim Dalı'nın olanakları kullanılarak, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuarında yürütülmüştür.

3.1 Deney Hayvanları

Bu çalışmada Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuarı'nda yetiştirilmiş toplam 16 adet, ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi dişi sıçan kullanıldı.

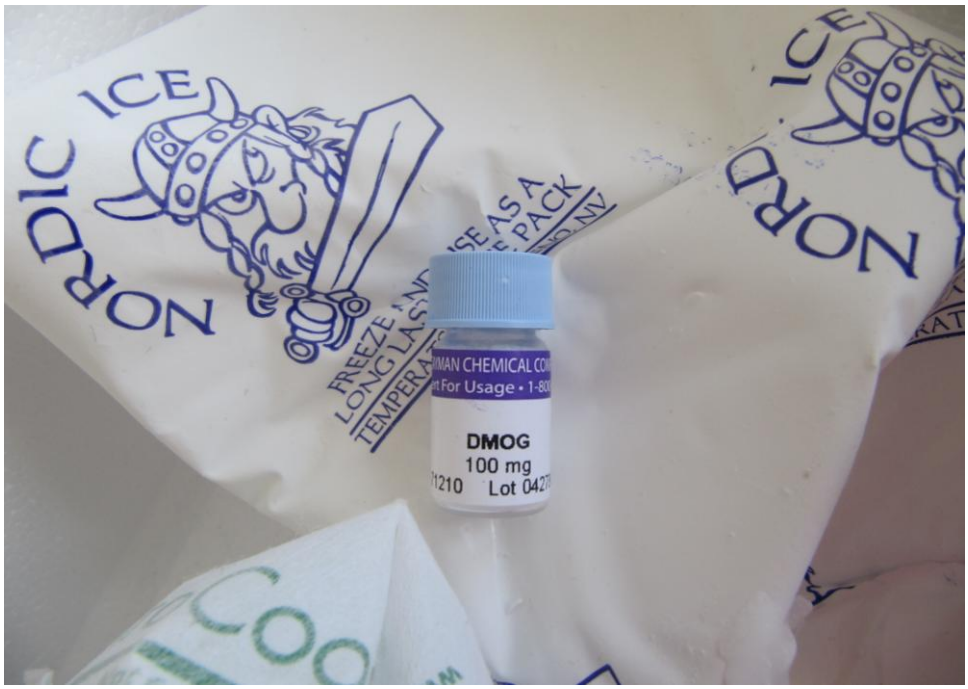
Sıçanlar hayvan laboratuarında uygun kafeslerde, 21 ± 2 santigrat derece sıcaklıkta ve ışıkların saat 08:00'de yakılıp, saat 20:00'de söndürülmesiyle 12 aydınlık - 12 saat karanlık ritminin sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi bir diyet ya da su kısıtlaması yapılmadı. Tüm hayvanlar ayrı kafeslerde barındırıldı.

3.2 Gereçler

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar:

1- DMOG 100 mg'lık preparat ('Cayman Chemical', katalog numarası:71210)
2- PBS (Fosfatlı tampon çözelti), pH 7.2
3- Temel cerrahi aletler (pens, penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)
4- Steril cerrahi gazlı bez
5- Steril enjektörler (1, 2.5, 5, 10 cc)
6- Steril cerrahi eldiven
7- Isıtmalı cerrahi deney masası
8- Povidone iodine

9- 3/0 keskin iğneli atravmatik cerrahi nylon ve prolen sütürler
10- Traş bıçağı
11- Serum fizyolojik
12- Formol
13- Ketamin baz (Ketalar, Pfizer)
14- Ksilazin (Rompun %2, Pfizer)
15- 3x9 cm'lik standart flep taslağı
16- Lazer Doppler akım ölçer (Laser Doppler flowmeter, MP 100 Biopac Systems Inc, Santa Barbara, ABD)
17- Dijital fotoğraf makinası (Canon Powershot SX 200 IS)
18- Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobu
19- Lam, Lamel
20- Hematoksilen Eozin (H-E) ve Mallory Azan (M-A) histolojik boyaları
21- Parafin
22- Ethanol



Şekil 3.1: -20 santigrat derecede muhafaza edilerek saklanmış DMOG.

3.3 Yöntem

3.3.1 Çalışma grupları

Hayvanlar her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde randomizasyon yöntemi ile öncelikle 2 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol grubu (grup 1) ve deney grubu (grup 2) olarak adlandırıldı.

2. gruptaki hayvanlara operasyondan 24 saat önce her hayvana 40 mg/kg dozunda olacak şekilde PBS ile sulandırılmış DMOG intraperitoneal yolla verildi. 1. gruptaki hayvanlara da aynı stresi yaşatmak için aynı hacimde yalnızca PBS (pH 7.2) enjeksiyonu yine operasyondan 24 saat önce intraperitoneal olarak uygulandı.

3.3.2. Cerrahi Teknik

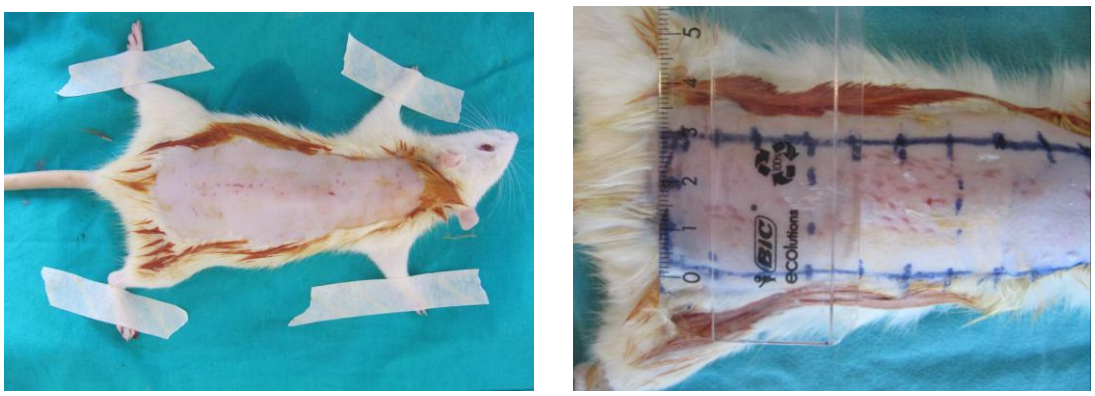
Deney başlamadan önce sıçanlara intraperitoneal yolla verilen 10mg/kg ksilazin + 80 mg/kg ketamin ile anestezi sağlandı. Her sıçanın sırt bölgesi ameliyat öncesi traş edilerek povidone iodine ile preoperatif hazırlık yapıldı (Şekil 3.2). Sıçan prone pozisyonda tespit edildi ve tüm cerrahi işlemler asepsi, antisepsi kurallarına uygun olarak aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

Sıçan dorsumunda her iki skapula ve posterior iliak çıkıntılar işaretlendi. 1:3 en boy oranında olacak şekilde 3x9 cm'lik kraniyal tabanlı dorsal yarımada flebi (McFarlane Flebi) planlandı. İnsizyonların ve sütürlerin standardizasyonu için flepler ve 1 cm aralıklarla atılacak sütürler taslağa uygun olarak çizildi (Şekil 3.2). Flepler kaldırılmadan önce fleplerin proksimal 1/3 orta noktası (3 cm) sabit bölgelerinden lazer Doppler ile 1 dakika süreyle kayıt alındı (Şekil 3.3). Flep kenarları deri altındaki pannikulus karnosus kası flebe dahil edilerek derin kas fasyası üzerine kadar kesildi. Deri ve altındaki pannikulus karnosus kasından oluşan flep, kas üzerindeki gevşek ve nispeten avasküler anatomik planda ilerlenerek kaldırıldı (Şekil 3.4). Flepler tekrar yerlerine 3/0 keskin iğneli atravmatik cerrahi prolen veya nylon sütürler ile adapte edildi. Cerrahiyi takiben aynı noktalardan lazer Doppler ile birer dakikalık kayıtlar alındı (Şekil 3.5). Sıçanlar cerrahi işlem tamamlandıktan sonra son

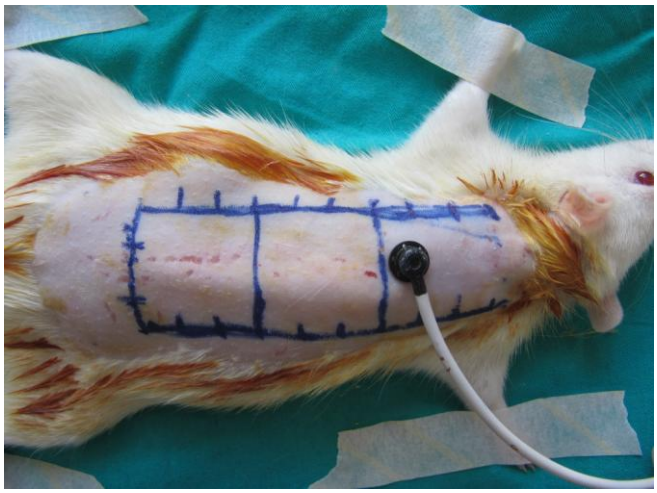
ölçümlerin yapılacağı güne kadar ayrı kafeslerde yeterli miktarda standart yem ve su ile beslendiler ve takip edildiler.

Postoperatif 7. günde sıçanlar yukarıdaki anestezi protokolüne uygun bir şekilde tekrar uyutulup, aynı noktalardan tekrar birer dakikalık lazer Doppler kayıtları elde edildi. Eğer postoperatif 7. günde kayıt noktası nekroz alanı içinde kaldı ise, distal kayıt nekroz sınırındaki sağlam alandan yapıldı. Postoperatif 7. gündeki ölçümlerden sonra flepler Canon Powershot SX 200 IS dijital fotoğraf makinesi ile fotoğraflandı (Şekil 3.6). Fotoğraf çekiminden sonra histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler için nekroz ve sağlam doku sınırlarından tam kat biyopsiler alındı.

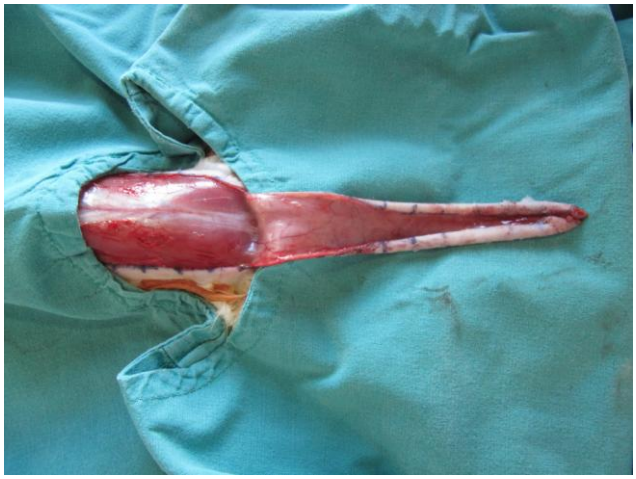
Deney protokolü sona erince sıçanlar yüksek doz eter inhalasyonu ile sakrifiye edildiler.



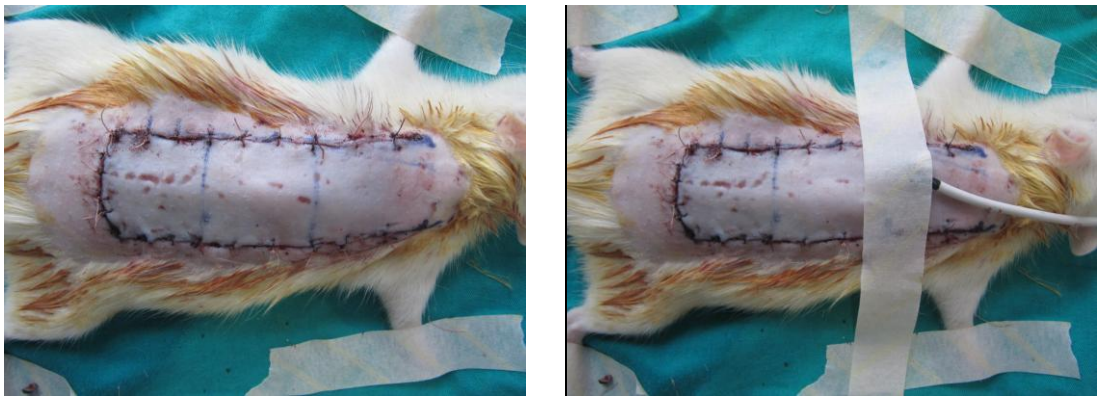
Şekil 3.2: Sıçanın preoperatif hazırlanması, flebin planması, sütüre edilecek ve lazer Doppler ile ölçüm yapılacak flep 1/3 proksimal noktalarının işaretlenmesi.



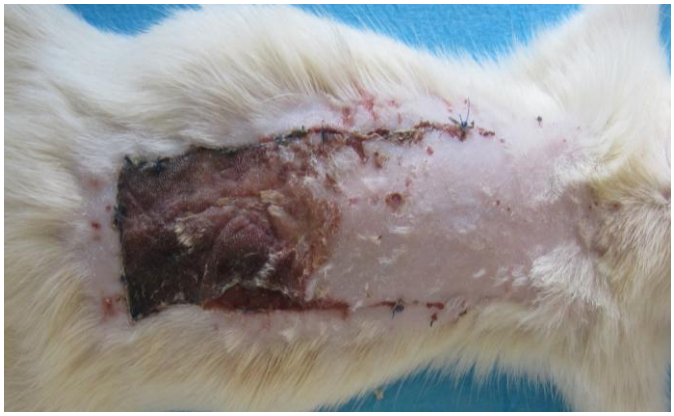
Şekil 3.3: Operasyon öncesi flep 1/3 proksimal kısmına yerleştirilen lazer Doppler probu ile kan akımı ölçümü.



Şekil 3.4: Planlamaya uygun olarak kaldırılmış dorsal random paternli yarımada flebi.



Şekil 3.5: Flep kaldırıldıktan hemen sonra flebin yerine 4/0 sütürlerle iade edilmesi ve aynı noktadan lazer Doppler kaydı alınması.



Şekil 3.6: Kontrol grubundan bir sıçanın flebinin postoperatif 7. gün görünümü.

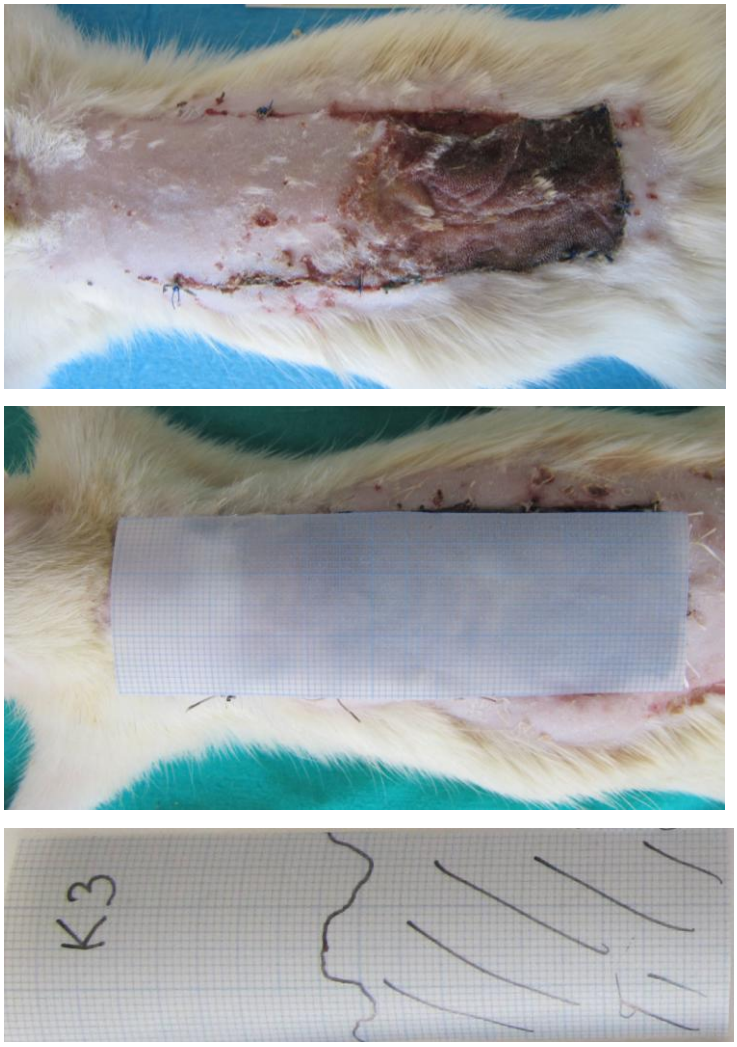
3.4 Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1 Genel Değerlendirme

Deneyde kullanılacak hayvanlar cerrahi işlem uygulanmadan iki hafta önceden başlamak suretiyle ağırlıkları haftada bir ölçüldü ve gruplar arası farklar karşılaştırıldı.

3.4.2 Flep Nekroz Alanı

Cerrahi işlemlerden sonraki 7. günlerde sıçanların sırtındaki fleplere milimetrik şeffaf asetat kağıtları yerleştirilerek planimetrik olarak nekroz yüzdeleri hesaplandı.



Şekil 3.7: Operasyon sonrası 7. günde gelişen nekroz ve nekroz yüzdesinin planimetrik olarak hesaplanması.

3.4.3 Laser Doppler Akım Ölçer

Operasyon öncesinde, flep yerine iade edildikten hemen sonra ve operasyon sonrası 7. günde, anestezi altında, fleplerin proksimal 1/3 sabit noktalarından, birer dakika süreyle laser Doppler akım ölçerin disk biçimli başlığı kullanılarak kayıtlar alındı (Şekil 3.7). Kayıt alma ve değerlendirme AcqKnowledge V.3.5.7 yazılımı ile yapıldı.



Şekil 3.8: Lazer Doppler akım ölçer.

Birer dakika süren kan akım kayıtlarında ortalama değerler değerlendirilmeye alınmıştır. Sıçanlar arasındaki varyasyonu ortadan kaldırmak için operasyon öncesi ölçümler bazal değer olarak kabul edilmiş ve bu değerlere göre hemen operasyon sonrası ve operasyon sonrası 7. gün değerleri yüzde değişim olarak ifade edilmiştir.

3.4.4 Histolopatolojik Değerlendirme

Gruplardan 7. günde flebe ait nekrotik ile sağlam doku arasındaki geçiş zonundan alınan 2x1 cm'lik doku biyopsileri %10'luk tamponlu formalin çözeltisine alınarak tespit edildi. Dereceli alkollerden geçirilerek dehidratasyon uygulanan dokular ksilene alınarak şeffaflanmaları tamamlanana kadar bekletildi. Şeffaflaşma sonrası 60°C etüvde 5 saat sıvı parafin infiltrasyonundan sonra dokular sert parafin

bloklara gömüldü. Bloklar buzdolabında +4°C'de bekletildi. Kesim işlemine başlamadan önce -18°C 'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model mikrotom ile 4 μm' lik kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen Eozin ve Mallory Azan histolojik boyaları ile boyandı ve Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskobuyla incelendi ve fotoğraflandı.

Örneklerde PMNL (polimorfonükleer lökosit) ve lenfosit yoğunluğu, kapiller damar proliferasyonu, papiller dermiste ödemli kollajen yoğunluğu, retiküler dermiste ödem varlığı, ekstravaze eritrosit yoğunluğu ve nekroz yaygınlığı ve yerleşimi olmak üzere yedi adet parametre incelendi (57, 58, 59). Dokularda nekroz varlığına rastlanılmadığından nekroz ve lokalizasyon parametreleri değerlendirmeye alınmadı.

Histolojik parametreleri değerlendirmek için Tablo 4.1'deki skorlama skalası kullanıldı.

Tablo 3.1: Histolojik değerlendirme parametrelerinin skorlanması.

	Yok	Az	Orta	Yoğun	Çok Yoğun
PMNL ve lenfosit yoğunluğu	0	1+	2+	3+	4+
Papiller dermiste ödem	0	1+	2+	3+	4+
Ekstravaze Eritrositler	0	1+	2+	3+	4+
Retiküler dermiste ödem	0	1+	2+	3+	4+

Damar yoğunluğu hesaplanırken de her hayvana ait kesitlerden birisi gelişi güzel seçilerek x40 büyütmede rastgele seçilen 4 alandaki tüm damarlar büyüklüklerine bakılmaksızın sayıldı, toplamı 4'e bölündü (60).

3.4.5 İstatiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS for Windows 15.0 paket programında yapılmıştır. Değerlendirmelerde kontrol ve deney gruplarının karşılaştırmalarında Student's T testi ve Mann-Whitney U testi, gruplarda lazerdeki zamana bağlı değişimler Paired T testi ile değerlendirilmiştir.

Tanımlayıcı değer olarak aritmetik ortalama ± standart sapma, medyan ve minimum - maksimum değerler kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık sınırı 0,05 olarak kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1 Genel Bulgular

Yapılan bu deneysel çalışmada 16 adet Wistar albino cinsi dişi sıçan kullanıldı. 8'er hayvandan oluşan kontrol ve ilaç gruplarından tüm hayvanlar operasyon sonrası 1. hafta sakrifiye edilinceye kadar yaşamını sürdürdü.

Deney öncesi tüm hayvan gruplarındaki hayvanların bazal ağırlık ölçümleri benzerdi (Kontrol grubu: 305,7 ± 13,4 g , İlaç grubu: 309,4 ± 14,8 g. p=0,40).

Her iki grupta cerrahi sonrası ağırlık kaybı gözlendi (Operasyon öncesi: 307,6 ± 15,6, postoperatif 7. gün: 280,3 ± 28,1 g).

4.2. Laser Doppler Akım Ölçer Bulguları

Deneyde kullanılan tüm hayvanlardan operasyon öncesi flep proksimal 1/3'lük kısmından elde edilen kan akımı ölçümleri, hayvanlar arası standardizasyonu sağlamak amacıyla 100 olarak kabul edildi. Flep yerine iade edildikten hemen sonra ve postoperatif 7. günde yapılan ölçümler ise bazal ilk değerin yüzdesi şeklinde ifade edilerek istatistiksel olarak değerlendirildi. Ölçümler ortalama değer üzerinden karşılaştırılmıştır.

Fleplerin kaldırılıp yerine tekrar iade edildiği postoperatif 0. günlerde operasyondan hemen sonra yapılan ölçümlerde kontrol ve deney gruplarında akım değerleri arasında anlamlı bir fark saptanmadı (Kontrol grubu: 61,45 ± 26,90 ve deney grubu: 57,69 ± 19,09; p>0,05). Postoperatif 7. günlerde kontrol ve deney gruplarında ölçülen akım değerleri karşılaştırıldığında deney grubunda akım değerlerinin kontrol grubundakilere oranlı anlamlı olarak fazla oldukları gözlendi (Kontrol grubu: 47,3 ± 28,94 ve deney grubu: 88,10 ± 32,63; p<0,05).

Kontrol grubunda 0. gün preoperatif ve 0. gün postoperatif ölçümler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş yaşandığı görüldü (Ortalama düşüş: 38.55 ± 26.90; p<0,01). Yine kontrol grubunda 0. gün preoperatif ve 7. gün postoperatif ölçümler karşılaştırıldığında yine istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş

yaşandığı görüldü. (Ortalama düşüş: 52,67 ± 28,94; p<0,001). Kontrol grubunda 0. gün postoperatif ve 7. gün postoperatif ölçümler karşılatırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş görülmedi. (Ortalama düşüş: 14,12 ± 26,29; p>0,05).

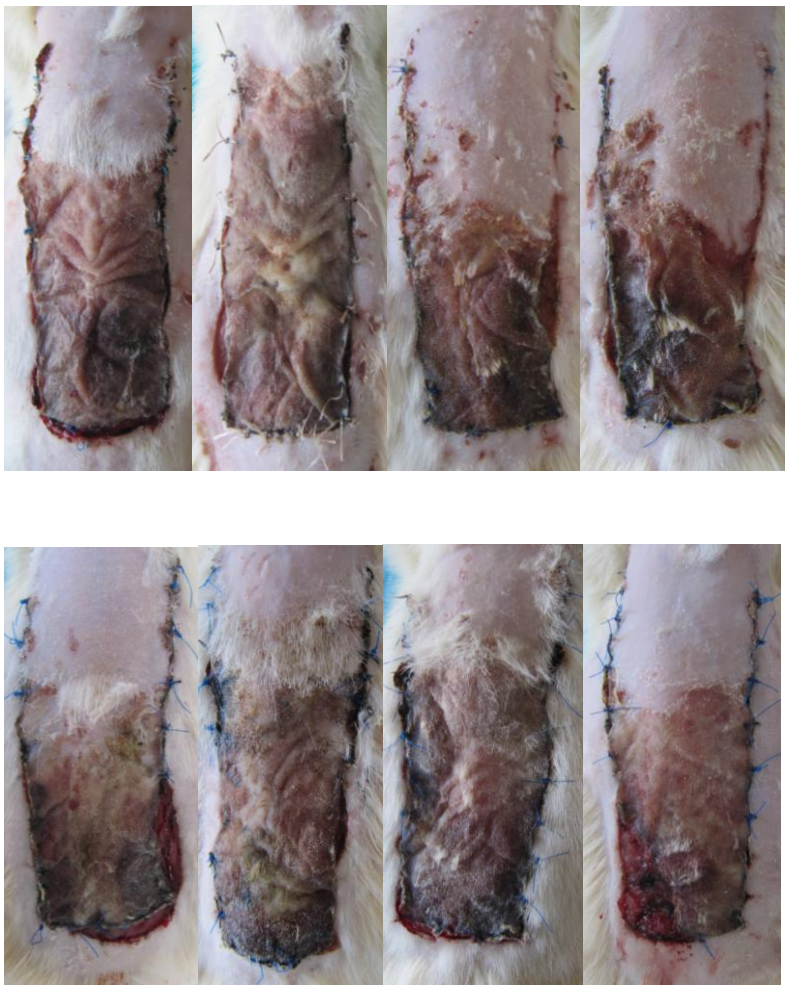
Deney grubunda 0. gün preoperatif ve 0. gün postoperatif ölçümler karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş yaşandığı görüldü (Ortalama düşüş: 42,31 ± 19,09; p<0,001). Deney grubunda 0. gün preoperatif ve 7. gün postoperatif ölçümler karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir düşüş yaşanmadığı görüldü. (Ortalama düşüş: 11,89 ± 32,63; p>0,05). Deney grubunda 0. gün postoperatif ve 7. gün postoperatif ölçümler karşılaştırıldığında ise istatistiksel olarak anlamlı bir artış görüldü. (Ortalama artış: 30,42 ± 34,52; p<0,05).

Kontrol ve deney gruplarında 0. gün preoperatif ve 7. gün postoperatif kan akımı ölçümlerindeki azalma miktarları karşılaştırıldıklarında deney grubundaki ortalama düşüşün kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde az olduğu görüldü (Kontrol grubu medyanı: 58,40. Kontrol grubu minimum ve maksimum değişim farkları: -8,05; 79,32. Deney grubu medyanı: 13,16. Kontrol grubu minimum ve maksimum değişim farkları: -44,62; 58,33; p<0,05).

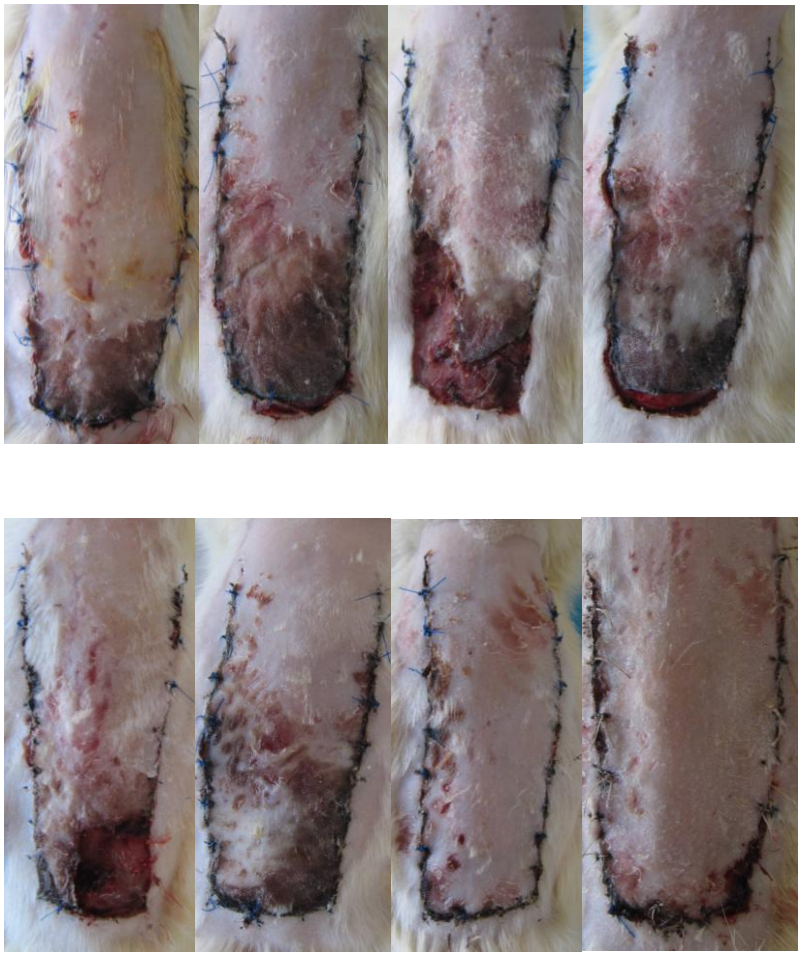
4.3. Flep Nekroz Alanı Bulguları

Bütün fleplerde postoperatif 7. günde gelişen nekroz alanlarının, ölçülen total flep alanlarına yüzdesi hesaplandı ve hesaplanan yüzdeler grupların karşılaştırılmasında kullanıldı. (Şekil 4.1, şekil 4.2).

Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında DMOG verilmiş grupta postoperatif 7. günde flep nekroz alanı yüzdesinin istatistiksel anlamda daha düşük olduğu gözlendi (Kontrol grubu: 60,69 ± 11,91 ve deney grubu: 24,86 ± 14,34; p<0,001).



Şekil 4.1: Kontrol grubundaki sıçanların fleplerinin postoperatif 7. gündeki görünümleri.



Şekil 4.2: DMOG verilmiş deney grubundaki sıçanların fleplerinin postoperatif 7. gün görünümü.

4.4. Histopatolojik Bulgular

7. günde alınmış olan doku örneklerinde kontrol ve deney gruplarında PMNL ve lenfositlerde, kapiller damarlarda, kolajen ve fibroblastlarda yoğunlaşmalar gözlendi. DMOG uygulanılan deney grubunda kontrol grubuna göre PMNL infiltrasyonu, ekstravaze eritrosit miktarı ve papiller ve retiküler dermiste ödem yoğunluğu düşük, yeni damar oluşumu ise yüksek bulundu (Şekil 4.1, Şekil 4.2).

İstatistiksel olarak bu veriler incelendiğinde PMNL infiltrasyonunun postoperatif 7. günde deney grubunda kontrol grubuna kıyasla anlamlı olarak daha az olduğu görüldü (Kontrol grubu medyanı: 3,00. Deney grubu medyanı: 1,00; p=0,052). Yine istatistiksel olarak ekstravaze eritrosit miktarları

karşılaştırıldıklarında deney grubunda kontrol grubuna oranla daha az ekstravazasyon olduğu görüldü (Kontrol grubu medyanı: 2,50. Deney grubu medyanı: 1,50; p=0,050). Fakat deney ve kontrol gruplarındaki papiller ve retiküler dermisteki ödem miktarları arasındaki fark karşılaştırıldıklarında deney grubunda kontrol grubuna oranla daha az bulunan ödem miktarının istatistiksel olarak anlamlı olmadığı görüldü (Papiller dermis kontrol grubu medyanı: 2,00. Papiller dermis deney grubu medyanı: 1,00. p>0,05. Retiküler dermis kontrol grubu medyanı: 1,00. Retiküler dermis deney grubu medyanı: 0,50. p>0,05).

Epitelizasyon her iki grupta da henüz tamamlanmamış olmakla birlikte deney grubunda daha ileri düzeyde olduğu gözlendi, kontrol grubunda iyileşmenin daha yavaş ilerlediği saptandı. İnflamasyon ilişkili hücreler kontrol grubunda daha dağınık yerleşim gösterirken deney grubunda daha sınırlı bir bölgede yerleşmekteydiler (Şekil 4.3, Şekil 4.4, Şekil 4.5A, Şekil 4.9).

Bağ dokusu hücreleri açısından deney grubunda fibroblast benzeri hücre sayısında artış gözlenirken kontrol grubunda PMNL-lenfosit hücreleri yoğun gözlendi. DMOG uygulanılan deney grubunda flep iyileşmesi hızlı gerçekleşirken kontrol grubunda iyileşme sürecinin 7. günde halen devam ettiği ışık mikroskobi düzeyinde gösterildi. (Şekil 4.4, Şekil 4.5, Şekil 4.6).

Ekstravaze eritrositlerin kontrol grubunda özellikle epidermis altında ve kas içinde yaygın gözlenmesine karşın deney grubunda damar sayısı daha fazla saptandı ve bu fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu.

Kolajenlerde ödem deney grubunda daha dar bir alan ile sınırlıyken kontrol grubunda hipodermise kadar olan alanda ödem bulgularına rastlandı, ödemli kollajen liflerinin arası açılmış olarak izlendi (Şekil 4.8, Şekil 4.9). Sonuç olarak ışık mikroskobunda; deney grubunda kontrol grubuna kıyasla gözlenen düşmüş PMNL, lenfosit, ekstravaze eritrosit sayıları ve artmış yeni damar oluşumu bulgularının skorları arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlı bulundu. Papiller ve retiküler dermisteki ödem azalmaları arasında ise anlamlı bir fark saptanmadı.

Tablo 4.1: Kontrol grubunda PMNL infiltrasyonu, papiller ve retiküler dermiste ödem ve ekstravaze eritrosit parametrelerinin skorlanması.

	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8
PMNL infiltrasyonu	+3	+3	+2	+3	+1	+2	+3	+4
Papiller dermiste Ödem	+2	+3	+1	+2	+1	+3	+1	+3
Ekstravaze eritrosit	+3	+4	+3	+2	+1	+2	+2	+3
Retiküler Dermiste ödem	+1	+2	+1	0	0	+3	+1	+3

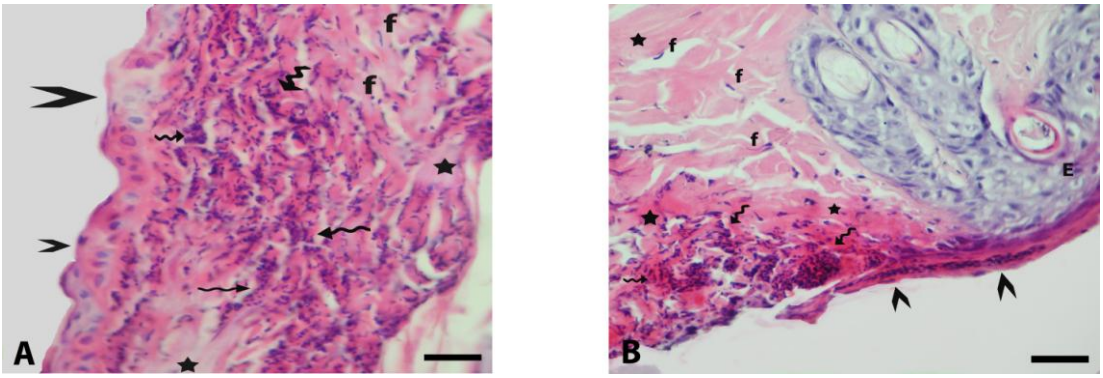
Tablo 4.2: Deney grubunda PMNL infiltrasyonu, papiller ve retiküler dermiste ödem ve ekstravaze eritrosit parametrelerinin skorlanması.

	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7	D-8
PMNL infiltrasyonu	+2	+1	+1	+1	+1	+3	+3	+1
Papiller Dermiste Ödem	+2	0	+1	+2	0	+1	+2	+1
Ekstravaze eritrosit	+1	+3	+2	0	0	+1	+2	+2
Retiküler Dermiste ödem	0	0	+1	+2	0	+1	0	+1

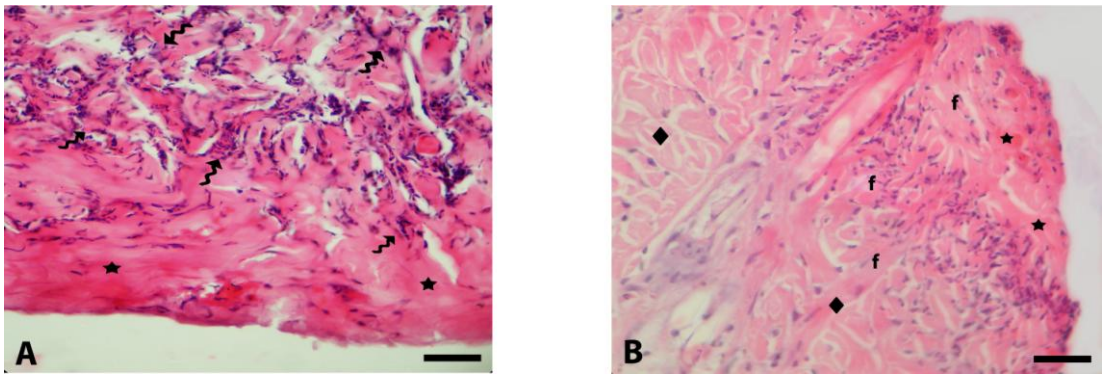
Damar yoğunlukları her hayvana ait bir preparatta rastgele seçilen 4 alandaki damarların sayılıp toplanması ve dörde bölünmesi sonucu hesaplandı (Tablo 4.3). Kontrol ve deney gruplarından elde edilen veriler karşılaştırıldıklarında deney grubunda damar yoğunluklarının anlamlı olarak daha fazla olduğu görüldü (Kontrol grubu: 6,31 ± 0,84. Deney grubu: 11,63 ± 1,41. $p<0,001$).

Tablo 4.3: Damar yoğunluklarının hesaplanması.

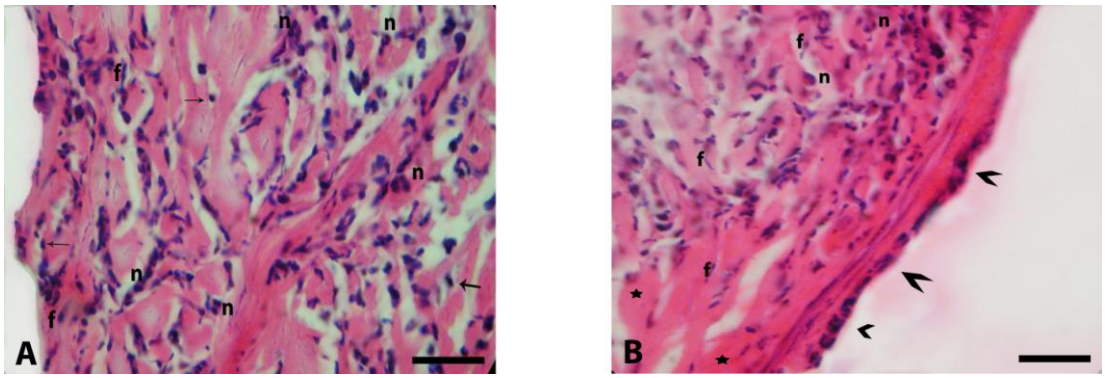
Kontrol grubu	**Deney grubu**
K-1: 25/4= 6,25	D-1: 45/4=11,25
K-2: 24/4= 6	D-2: 44/4= 11
K-3: 28/4= 7	D-3: 47/4= 11,75
K-4: 28/4= 7	D-4: 49/4= 12,25
K-5: 27/4= 6,75	D-5: 59/4= 14,75
K-6: 21/4= 5,25	D-6: 45/4= 11,25
K-7: 20/4= 5	D-7: 41/4= 10,25
K-8: 29/4= 7,25	D-8: 42/4= 10,50



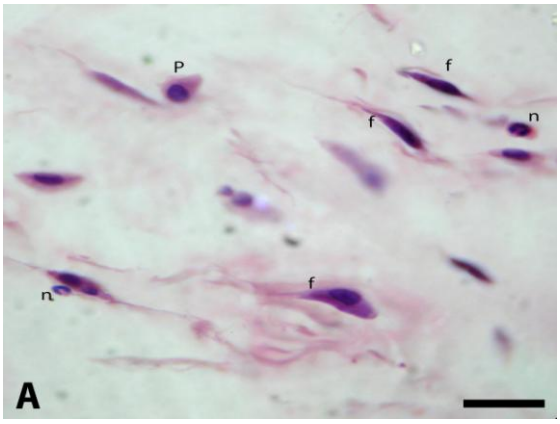
Şekil 4.3: A: Kontrol grubu yara yerini gösteren kesit. Kıvrımlı ok: PMNL infiltrasyonu. Yıldız: Papiller dermis ve retiküler dermisteki ödemli kollajen. Sivri ok: Epitelizasyon bölgesi. f: Fibroblast. Boya: H-E, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubu sağlam bölge-yara yeri geçiş bölgesi. Kıvrımlı ok: PMNL infiltrasyonu. Yıldız: Papiller dermis ve retiküler dermisteki ödemli kollajen. Sivri ok: Epitelizasyon bölgesi. f: Fibroblast. E: Sağlam bölge epidermis katı, Boya: H-E, x40 büyütme Bar: 0,5 µm.



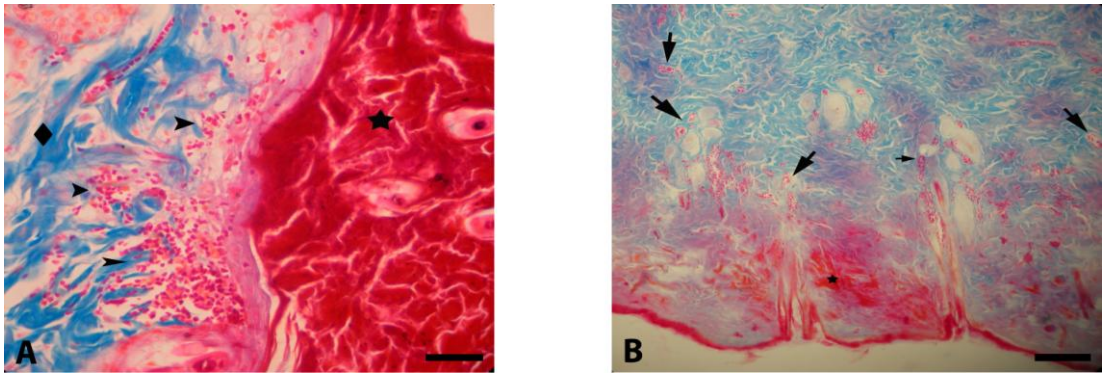
Şekil 4.4: A: Kontrol grubu papiller ve retiküler dermiste ödem, kollajen lifleri arası ayrılmalar. Kıvrımlı ok: PMNL infiltrasyonu. Yıldız: Ödemli kollajen, Boya: H-E, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubu iyileşme bölgesi, PMNL'lerin sınırlı alanda olduğu ve ödemin papiller dermis alanıyla sınırlı olduğu gözlenmekte. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Karo: Normal kollajen lifleri. f: Fibroblast. Boya: H-E, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm.



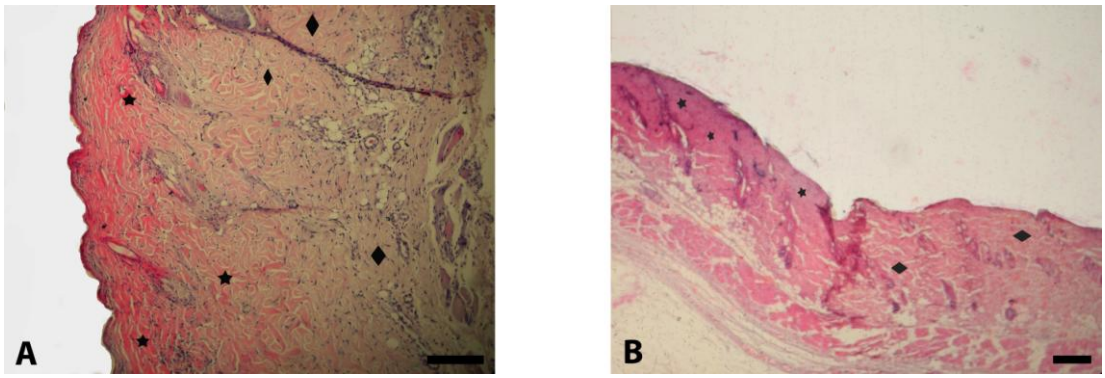
Şekil 4.5: A: Kontrol grubu yara yeri PMNL ve lenfosit infiltrasyonu. n: Nötrofil. f: Fibroblast. İnce ok: Lenfosit. Boya: H-E, x100 büyütme. Bar: 0,25 µm. B: Deney grubu inflamasyon bölgesi hücreleri. Fibroblastların ağırlıklı olduğu gözlenmektedir. F: Fibroblast, n: nötrofil. Yıldız: Papiller dermiste ödem. Sivri ok: Epitelizasyon gösteren hücreler. Boya: H-E. x100 büyütme. Bar: 0,25 µm.



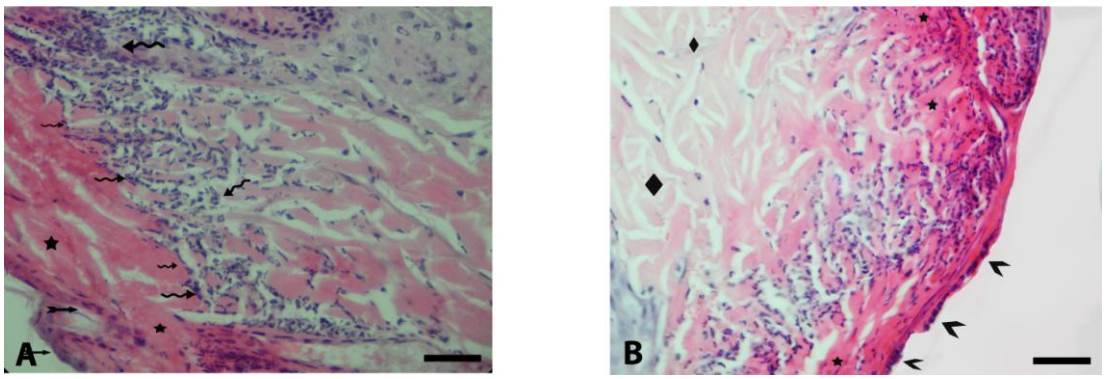
Şekil 4.6: Deney grubu bağ dokusu hücreleri. Yeni oluşan kollajen lifleri arasında çok sayıda düzgün sınırlı ve belirgin çekirdekli fibroblast benzeri hücre izlenmiştir. p: Plazmosit. n: nötrofil. f: Fibroblast. Boya: H-E, x100 büyütme. Bar: 0,25 µm.



Şekil 4.7: A: Kontrol grubu yara yeri altında damardışı (ekstravaze) eritrosit yoğunluğu göze çarpmakta. Yıldız: Ödemli granulasyon dokusu. Karo: Normal kollajen lifleri. Ok başı: Ekstravaze eritrositler. Boya: M-A, x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubunda yeni oluşan ve varolan damarların yoğun görünümü dikkat çekmekteydi. Ok: Vasküler yapılar. Boya: M-A. x10 büyütme. Bar: 2 µm.



Şekil 4.8: A: Kontrol grubunda papiller ve retiküler dermiste kollajen liflerinde ödem geniş bir alanı kapsamaktaydı. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Karo: Normal kollajen lifleri. Boya: H-E, x10 büyütme. Bar: 2 µm. B: Deney grubunda ödem genellikle yara yerinde papiller dermis bölgesi ile sınırlıydı, diğer alanlardaki kollajen lifleri ve kas yapıları normal görünümdeydi. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Karo: Normal kollajen lifleri. Boya: H-E. x4 büyütme. Bar: 2 µm.



Şekil 4.9: A: Kontrol grubu ödemli kollajen ve PMNL infiltrasyonu, ödemli kollajen lifleri arasında ayrılmalar mevcut. Kıvrımlı ok: PMNL ve lenfosit infiltrasyonu. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Kuyruklu ok: Epitelizasyon bölgeleri. Boya: H-E. x40 büyütme. Bar: 0,5 µm. B: Deney grubu sınırlı inflamasyon ve ödem bölgesi, ödemli bölgenin papiller dermisle sınırlı olması dikkat çekici. Karo: normal kollajen lifleri. Sivri ok: Epitelizasyon bölgesi. Yıldız: Ödemli kollajen lifleri. Boya: H-E. x40 büyütme. Bar: 0,5 µm.

4. TARTIŞMA

Vücudumuzu saran deri ve derialtı dokuları, hayati önem taşıyan organları örtmektedir. İnsan derisindeki defektlerinin kapatılması, rekonstrüktif cerrahinin önemli uğraş alanlarından biridir. Bu defektlerinin kapatılmasında en uygun fonksiyonel ve estetik yaklaşım fleplerin kullanılmasıdır. Flep cerrahisi plastik cerrahinin temel taşlarından birisidir. Planlanan flebin boyu uzadıkça flep yaşayabilirliğinde azalma olmakta, bu durum kendisini özellikle flep distalinde nekroz ve doku kaybı olarak göstermektedir (61, 62, 63, 64). Cerrahi girişimler dokular için bir travma ve iskemi nedenidir. Cerrahi travma ve iskemi akut olarak kaldırılan flepte enflamatuar cevabın oluşmasına neden olur. Flep nekrozu oluştuğu zaman sekonder iyileşmeye yardımcı olmak amacıyla zaman alan ve tekrarlayan pansumanlar ve hatta operasyonlar gerekebilmektedir. Bu durum hastanede yatış süresini, morbiditeyi ve maliyeti artırmaktadır (65).

Distal cilt flebi nekrozunun kesin mekanizması belirsiz olmasına rağmen başlıca vazospazm, tromboz ve yetersiz kan akımı sorumlu tutulmaktadır. Bu problemi aşabilmek için birçok fikir ortaya atılmış, birçok tedavi yöntemi denenmiştir. Kan akımını artıran sempatolitikler, antikoagülanlar, antienflamatuar ajanlar gibi birçok farmakolojik ajan ve geciktirme fenomeni gibi yöntemler kullanılmış ayrıca iskemik hücrelerde hücre zar stabilizasyonu sağlanmaya çalışılmıştır (66, 67, 68, 69, 70).

Hart ve arkadaşları Sildenafil'in flep yaşayabilirliğine etkisini incelemişlerdir. Bu çalışmada ajan intraperitoneal olarak verilmiş ve erken dönem flep yaşayabilirliğine önemli katkısının olduğu gözlenmiştir (71). Erçöçen ve arkadaşları flep yaşayabilirliğini artırma amacı ile L-Arginin ve Iloprost'u intravenöz infüzyon olarak uygulamışlardır. Çalışma sonucunda intravenöz infüzyon uygulanan grupta flep yaşayabilirliğinin arttığını gözlemişlerdir (72). Pickens ve arkadaşları da domuzlarda random deri flebi kaldırmadan 3 ay önce oral Pentoksifilin uygulamışlar, ancak çalışma sonucunda kontrol grubu ile önemli bir fark saptayamamışlardır (73). Flep yaşamını artırma amacı ile uygulanan ajanların sayısını ve yöntemlerini artırmak

mümkündür. Bizim çalışmamızda olduğu gibi yukardaki çalışmalarda da ajanlar sistemik olarak hayvanlara verilmiştir.

Birçok plastik cerrahi tekniğinde anjiogenezin önemli bir yeri vardır. Yara iyileşmesi, açık yaraların tedavisi, kronik ülserlerin tedavisi, cilt greftlerinin veya diğer greftlerin yaşaması, random, aksiyal veya serbest fleplerin yaşaması veya prefabrike fleplerde yeni damar sistemlerinin oluşması anjiogeneze büyük ölçüde bağımlıdır. Şimdiye kadar yapılan anjiogenezle ilgili çalışmaların çoğunluğu miyokard iskemisini ve ekstremite iskemisini hedef almasına rağmen artmakta olan bilgi birikiminden plastik ve rekonstrüktif cerrahlar ve dolayısıyla hastaları da yararlanmaktadır.

Vasküler endotelyal hücreleri üzerinde vaskülojenik veya anjiojenik faktör olarak anılmayı sağlayacak kriterleri karşılayan en önemli faktör VEGF'dir. VEGF; anjiojenik, mitojenik ve vasküler geçirgenliği artıran bir proteindir ve endotel hücrelerinde nitrik oksit sentazı uyarma yoluyla vazodilatasyona neden olduğu ve aynı zamanda hücre göçünü uyarıp, apoptozisi inhibe ettiği belirtilmiştir (16). Sığır adrenal ve serebral korteksinden, fetal ve yetişkin aortundan ve insan umblikal veninden izole edilen endotel hücreler üzerinde yapılan çalışmalarda hücre dizilerinin büyümesini arttırdığı gösterilmiştir (74). VEGF'nin hedef hücre spesifitesi vasküler endotelyal hücreler ile sınırlıdır. VEGF'nin, doğal olarak iskemi reperfüzyon hasarı yaratılmış cilt ve kas fleplerinde arttığı gösterilmiştir. Eksojen kullanımında ise, flep yaşayabilirliğini artırdığı (75), subkritik iskemi halindeki kas fleplerinde perfüzyonu arttırdığı (76), tüp fleplerinin maturasyonunu hızlandırdığı gösterilmiştir (77, 78). Bu etkilerini preparatın direkt enjeksiyonu şeklinde veya çeşitli virüslerin genetik materyallerine eklenerek, virüslerin inoküle edildiği yerlerde VEGF ekspresyonu sağlayarak gösterdiği kanıtlanmıştır (79).

VEGF'nin kültüre korneal endotelyal hücreler, vasküler düz kas hücreleri, keratinositler, insan sarkoma hücreleri veya lens epitelyal hücreleri üzerinde hiçbir mitojenik etkisi olmadığı gösterilmiştir (74). Zhan ve arkadaşları, ratlarda TRAM (transvers rektus abdominis kası flebi) flep modelinde vasküler endotelyal büyüme faktörü plazmid DNA'sını subkütan fasyal plana preoperatif olarak enjeksiyon yöntemi ile uygulamışlardır. Çalışma sonucunda enjeksiyon yapılan grupta anjiogenez ve deri yaşama oranının artmış olduğunu bulmuşlardır (80).

Yapılan araştırmalar VEGF sentezinin HIF-1 kompleksinin, VEGF-A geninin çoğaltıcı sekansına bağlanmasıyla uyarıldığını göstermektedir. DMOG, HIF-1 alfa sistemi aracılığıyla VEGF sentezine etki eden pro-anjiogenik bir ajan olarak kabul edilmektedir (55, 56).

Bu çalışmada, Wistar albino cinsi dişi sıçanlarda, 3x9 cm uzunluğundaki kraniyal tabanlı dorsal yarımada fleplerinde flep yaşayabilirliğini artıracağını düşündüğümüz DMOG'nin etkilerini araştırdık. Makroskopik inceleme, planimetrik alan ölçümleri, laser Doppler kan akımı ölçümü ve histopatolojik parametreler kullanarak flep sağ kalım oranlarını değerlendirdik. Literatürü taradığımızda, DMOG'nin daha önce flep yaşayabilirliği ile alakalı bir çalışmada kullanılmadığını gördük.

Çalışmada -20 C'de kristal katı formunda 'Cayman Chemical' şirketinden temin ettiğimiz DMOG'yi kullanım talimatına uygun olarak PBS (pH 7,2) çözeltisinde 10 mg/ml konsantrasyonunda olacak şekilde hazırladık. Uygun çözeltiyi hazırladıktan sonra DMOG grubundaki sıçanlara 40 mg/kg dozunda olacak şekilde intraperitonel yolla enjekte ettik. DMOG'nin serebral iskemi oluşturulmuş ratlarda sinir dokusu üzerine olan etkisinin araştırıldığı bir çalışmada sıçanlara hem 40 mg/kg hem de 200 mg/kg dozlarında verilen DMOG'nin uygun doz aralığı da araştırılmış ve daha düşük olan 40 mg/kg dozunun 200 mg/kg doza oranla enfarkt alanını daha fazla azalttığı gözlenmiş (81). DMOG'nin iskemi oluşturulmuş fare iskelet kası üzerinde (53) ve sıçanlarda myokard kası üzerine etkilerinin araştırıldığı (82) benzer çalışmalarda da 40 mg/kg etkin doz kullanılmıştır. Asikainen ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada DMOG'nin yüksek dozlerda hücrelere toksik etki yaptığı gösterilmiştir (83). DMOG'nin HIF-1 alfa aktivitesini en fazla iskemi yaratılmadan önce verildiğinde artırdığı kesin bir şekilde gösterilmiştir (84). Zhao'nun myokard kası üzerinde yaptığı çalışmada olduğu gibi biz de DMOG'yi cerrahi müdahaleden 24 saat önce intraperitonel yolla enjekte ettik (82).

HIF-1, alfa ve beta alt ünitelerinden oluşan heterodimerik bir transkripsiyon faktörüdür. Beta alt ünitesi düzeyleri farklı oksijen konsantrasyonlarında değişim göstermezken alfa alt ünitesi ortamdaki oksijen konsantrasyonuna göre büyük değişim gösterir. Normal oksijen konsantrasyonlarında HIF-1 alfa proteini prolil 4-hidroksilaz enzimi ile oksijen varlığında hızlıca yıkılmaktadır. Hipoksik ortamlarda

bu enzim işlevini yeterli oksijen olmadığından gösterememektedir. Böylece HIF-1'in, oksijen homeostazında önemli bir rolü olduğu aşikardır (85, 86). Zhao'nun myokard kasında iskemi reperfüzyon hasarını araştırdığı çalışmada da HIF-1 alfa düzeyinin sham grubunda çok düşük, iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulmuş kontrol grubunda yüksek ve en fazla da DMOG verilmiş iskemi reperfüzyon hasarına uğratılmış grupta yükseldiği gözlenmiştir (82). Milkiewicz'in fare iskelet kaslarında yaptığı benzer bir çalışmada da aynı sonuçlar görülmüştür (53).

Rey ve arkadaşlarının fare ekstremitelerinde iskemi-reperfüzyon hasarı ile HIF-1 aktivitesini incelediği bir çalışmada, DMOG verilmiş kemik iliğinden köken almış anjiogenik hücrelerin etkileri gözlenmiş. HIF-1 ile yakından ilişkili GLUT1 (glukoz taşiyıcı gen -1) ve VEGFR1 (vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörü -1) genlerinin mRNA kodlamalarında artış tespit edilmiş ve iskemik alandaki enflamatuar hücrelerin geri çekilmesinde artış gözlenmiş (87). DMOG ayrıca endotelyal ve proanjiogenik myeloid hücreler için önemli bir belirteç olan CD31 (PECAM-1; trombosit endotelyal adhezyon molekülü)'in de hücre yüzeylerindeki düzeylerini artırmış (88). Ockaili'nin tavşanlarda iskemik myokard kasında HIF-1 aktivitesini incelediği bir çalışmada DMOG'nin proinflamatuar sitokinleri inhibe ettiği, nötrofil sekestrasyonunu azalttığı ve heme-oksijenaz-1 aktivitesini artırdığını göstermiştir (84). Bu verilerini in vitro mikrovasküler endotel hücreleri üzerindeki çalışmalarla heme-oksijenaz aktivitesini DMOG yoluyla artırarak desteklemişlerdir. Bu in vitro çalışmalar, DMOG'nin interlökin-8 sekresyonunu azalttığı ve böylece nötrofil sekestrasyonunun azaldığını göstermiştir. Bu nokta bize HIF-1 yolağının, iskemi-reperfüzyon hasarında da antienflamatuar etkisi olduğunu göstermektedir. Çalışmamızda postoperatif 7. günde deney grubundaki hayvanlarda kontrol grubundakilere oranla nötrofil infiltrasyonu ve ekstravaze eritrosit miktarlarının istatistiksel olarak anlamlı ölçülerde düşük olduğunu gördük. Fakat papiller ve retiküler dermiste görülen ödem farklarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark görmedik.

Natarajan ve arkadaşlarının iskemi oluşturulmuş myokard kası üzerinde yaptığı bir çalışmada DMOG'nin hücrelerde apoptozisi belirgin olarak azalttığını gözlemiştir (89).

Vasküler gelişimin başlangıç sürecinde endotel hücrelerine spesifik bir reseptör olan Flk-1'in vasküler gelişimde önemli bir role sahip olduğu düşünülmektedir (90). Flk-1 ekspresyonunu HIF-2 alfa'nın aktive ettiği Elvert'in yaptığı çalışmayla gösterilmiştir (91). Milkiewicz'in fare iskelet kaslarında iskemi-reperfüzyon hasarını incelediği çalışmada anjiogenezin sadece Flk-1 ve HIF-1 alfa proteinleri artış gösterdiğinde anlamlı olarak arttığı gösterilmiştir (53). Yine Milkiewicz'in sıçan iskemik kaslarında yaptığı başka bir çalışmasında (92) anjiogenez için sadece artmış VEGF proteinin değil aynı zamanda artmış Flk-1 düzeyinin de olması gerektiği ve yeni kapiller oluşumu olan bölgelerdeki hücresel proliferasyonun artmış Flk-1 düzeyleri ile korele olduğu sonucuna ulaşılmıştır (92, 93).

DMOG'nin HIF-1 alfa yolağı üzerinden anjiogenezi uyardığı pek çok farklı dokuda yapılan çalışmalarda da kanıtlanmıştır. İnce bağırsak iskemi reperfüzyon hasarına HIF-1 yolunun etkisinin araştırıldığı bir çalışmada DMOG HIF-1 yolağının uyarılmasında kullanılmıştır (94). Shen'in farelerde oluşturulmuş femur fraktürlerinde anjiogenez ve yeni kallus oluşumunu incelediği bir çalışmada DMOG'nin bu modellerde anjiogenezi artırdığını göstermiştir (95). Asikainen ve arkadaşlarının primat akciğer hücre kültürlerinde HIF yolağını araştırmak için yapmış olduğu bir in vitro çalışmada, hiperoksik ortamlarda bile DMOG'nin anjiogenezi artırdığını göstermişlerdir (83). Çalışmamızda postoperatif 7. günde deney grubundaki hayvanlarda kontrol grubundakilere oranla istatistiksel olarak anlamlı bir düzeyde anjiogenezin artmış olduğunu gördük. Elde edilen laser Doppler akım ölçümlerinde de postoperatif 7. günlerde kontrol ve deney gruplarında ölçülen akım değerleri karşılaştırıldığında deney grubunda akım değerlerinin kontrol grubundakilere oranlı anlamlı olarak fazla oldukları gözlendi. Ayrıca kontrol ve deney gruplarında 0. gün preoperatif ve 7. gün postoperatif kan akımı ölçümlerindeki azalma miktarları karşılaştırıldıklarında deney grubundaki ortalama düşüşün kontrol grubuna oranla istatistiksel olarak anlamlı bir şekilde az olduğu görüldü.

NO (nitrik oksit) insan vücudunda vasodilatasyon, antitrombotik, antienflamatuar ve antiproliferatif etkileri mevcuttur. Daha önce yapılmış çalışmalarda normal oksijen konsantrasyonlarında NO donörlerinin HIF-1 alfa ekspresyonunu stimüle ettiği ve bunun sonucunda iNOS (indüklenebilir nitrik oksit

sentetaz) ekspresyonunun artarak NO oluşumunu artırdığı gösterilmiştir (96). Nagel ve arkadaşlarının DMOG'nin serebral iskemi oluşturulmuş ratlarda sinir dokusu üzerine olan etkisini araştırdığı bir çalışmada DMOG'nin VEGF sentezini uyarmasının yanında eNOS (endotelyal nitrik oksit sentetaz) aktivitesini artırdığı da gözlenmiştir (81). Yine aynı çalışmada, DMOG'nin EPO (eritropoetin) sentezini stimüle ettiği de gözlenmiştir. EPO, vücutta primer olarak kırmızı kan hücreleri yapımını stimüle eden ayrıca yara iyileşmesi (97) ve beyin dokusunda sinir iyileşmesi (98) üzerine pozitif etkileri olduğu düşünülen bir hormondur. Çalışmamızda da DMOG uygulanılan deney grubunda flep iyileşmesi hızlı gerçekleşirken kontrol grubunda iyileşme sürecinin 7. günde halen devam ettiği ışık mikroskobi düzeyinde gösterilmiştir. DMOG, nonselektif bir prolil-hidroksilaz inhibitörü olarak 2-oksaglutarat bağımlı tüm oksijenazları etkileyerek DNA tamiri, karnitin biyosentezi, kolajen modifikasyonları, eritropoez (EPO) sentezini uyarmak ve krebs döngüsüne etkileri (glikoliz) gibi hücrelerde bir dizi önemli hücresel işlevi etkilemektedir (99, 100, 101). Bu parametreler DMOG'nin sadece VEGF üzerinden anjiogenezi uyarması ile değil aynı zamanda anjiogeneze bu faktörlerin sinerjistik etki ettiğini göstermektedir ve DMOG'nin başka birçok mekanizma ile flep yaşayabilirliğine katkıda bulunduğunu düşündürmektedir.

5. SONUÇLAR

Sıçanlarda dorsal random paternli fleplerde sistemik olarak verilen DMOG'nin yaşayabilirlik üzerine etkisinin araştırıldığı bu çalışmada 2 temel sonuca ulşaılmıştır:

1. DMOG'nin sıçan random paternli yarımada fleplerinde yeni damar oluşumunu artırmak suretiyle flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir.

2. DMOG'nin sıçan random paternli yarımada fleplerinde enflamasyonu azaltmak suretiyle flep yaşayabilirliğini artırdığı gösterilmiştir.

Flep yaşayabilirliğini arttırmak için deneysel çalışmalarda denenen birçok farmakolojik ajanın klinik kullanımları çok sınırlı kalmıştır. VEGF bu farmakolojik ajanlardan en çok umut vaat edilenlerden birisidir. Yapılan birçok çalışma ile etki mekanizması, fizyolojisi tanımlanmış ve deneysel çalışmalarda çok başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Yapılan bazı araştırmalarda insan tümör hücrelerinin bazılarında VEGF'nin eksprese edilmesi onkolojik birtakım yan etkilerinin olabileceği şüphesini uyandırmaktadır. Bir büyüme faktörü olarak insanlarda muhtemel efektif kullanımı oldukça zor olan VEGF'nin farmakolojik bir ajan olarak verilmesi yerine DMOG gibi sentezini artıran farmakolojik maddelerin kullanılması daha uygun olacak gibi gözükmektedir.

DMOG gibi farmakolojik bazı maddelerin yapılacak deneysel çalışmalar ile insanlar üzerinde bir zararı olmadığı ve insanlar üzerinde kolaylıkla kullanılabilceği ispatlanırsa, bu tip farmakalojik ajanların gerektiği zaman iskemi hasarından kurtulmada ve flep cerrahisi sonrası gelişen problemleri önlemede kullanılması komplikasyon oranlarını azaltacaktır. Bu çalışmanın DMOG'nin klinik kullanımı açısından bir temel teşkil edeceği düşüncesindeyiz.

DMOG, ilerde klinik uygulamalarda kullanılabilecek uygun bir ilaç olarak yerini almayacak olsa bile bu çalışmanın, prolil hidroksilaz inhibisyonu, HIF-1 yolağı, VEGF ve bunun tetiklediği hücresel mekanizmaların iskemik dokuların yaşayabilirliğine olan etkilerinin incelenmesi açısından katkısı olabileceğini ummaktayız.

ÖZET

Sıçanlarda Dorsal Random Paternli Fleplerde Sistemik Olarak Verilen ‘‘Dimetiloksalilglisin’’in Yaşayabilirlik Üzerine Etkisinin Araştırılması

Amaç: DMOG, HIF-1 alfa sistemi aracılığıyla etki eden pro-anjiogenik bir ajan olarak kabul edilmektedir. Flep cerrahisinde yeni damar oluşumunun önemi düşünüldüğünde DMOG flep kanlanmasının artırılmasına yardımcı olabilecek bir ajan olarak düşünülmelidir. Bu çalışmada sıçan dorsal yarımada fleplerinde DMOG’nin flep yaşayabilirliğine olan etkisi araştırılmıştır.

Yöntem: Sıçanlar, her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde 2 gruba randomizasyon yöntemi ile ayrıldı. 1. gruba Mcfarlene dorsal yarımada flebi kaldırılıp yerine iade edilmeden 24 saat önce intraperitoneal olarak sadece 1 cc PBS (pH 7,2) intraperitonel yolla enjekte edildi. 2. gruba ise aynı operasyondan 24 saat önce 40 mg/kg dozunda DMOG, 1 cc PBS (pH 7,2) içinde çözülerek intraperitoneal yolla enjekte edildi. Flepler kaldırılmadan önce fleplerin 1/3 proksimal noktalarından lazer Doppler ile kayıt alındı. Flepler yerine iade edildikten hemen sonra ve postoperatif 7. günlerde de aynı noktalardan kayıtlar tekrarlandı ve bu kayıtlar biyositatistiksel olarak karşılaştırıldı. Postoperatif 7. günlerde flepler fotoğraflandı ve hepsinin nekroz alanı / tüm flep yüzdesi planimetrik ölçüm yontemi ile hesaplandı. Daha sonra histopatolojik incelemeler için nekroz ve sağlam doku sınırlarından tam kat biyopsiler alındı ve hayvanlar sakrifiye edildi. Alınan biyopsiler ışık mikroskopu altında PMNL infiltrasyonu, ekstravaze eritrosit miktarı, papiller ve reitküler dermiste ödem ve yeni damar oluşumu açısından incelenip karşılaştırıldı.

Bulgular: 2 grup arasında postoperatif 7. gün nekroz alanı oranları karşılaştırıldığında 2. grupta nekroz oranının anlamlı olarak daha az olduğu gözlendi. Laser Doppler ölçümleri karşılaştırıldığında da deney grubundaki sıçanlarda postoperatif 7. gün kan akımlarının kontrol grubundaki sıçanlara oranla operasyon öncelerine göre daha az oranda azaldıkları görüldü. Yapılan histopatolojik incelemelerde dimetiloksalilglisin (DMOG) uygulanılan deney grubunda kontrol grubuna göre PMNL infiltrasyonu, ekstravaze eritrosit miktarı anlamlı olarak düşük, yeni damar oluşumu ise yüksek bulundu.

Sonuç: Yapılan bu çalışmada dimetikoksalilglisin, sıçan dorsal yarımada fleplerinde anijiogenezi artırarak ve enflamasyonu azaltarak flep yaşayabilirliğini artırmıştır.

Anahtar Sözcükler: Flep yaşayabilirliği, dimetiloksalilgilisin, vasküler endotelyal büyüme faktörü, HIF-1 yolağı, anjiogenez

SUMMARY

Study of the Effect of Dimethyloxalylglycine on Flap Viability in Randomly Patterned Rat Dorsal Peninsula Flaps

Aim: DMOG is accepted as an pro-angiogenic compound that acts thorough HIF-1 pathway. As we know the importance of anjiogenesis in flap surgery, DMOG should be considered as a compound that can increase anjiogenesis in flaps. In this study we investigate the effect of DMOG on flap viability on randomly patterned rat semi-island flaps.

Methods: Rats were divided into 2 groups with 8 rats in each one within randomised pattern. 1 cc of PBS (pH 7,2) alone was injected intraperitoneally 24 hours before the elevation of Mcfarlene dorsal peninsula flap to the rats of group 1. 40 mg/kg DMOG that was dissolved in 1 cc of PBS (pH 7,2) was injected intraperitoneally 24 hours before the elevation of same flaps in group 2. Before the elevation of flaps in both groups, laser Doppler recordings were taken from the proximal 1/3 points of the flaps. Immediately after the elevation of the flaps and on postoperative day 7, inscriptions were repeated from the same points and the results were compared biostatistically. Photographs were taken on preoperative day 7 and the percentage of necrosis area over the total flap area was calculated by planimetric calculation. Finally full thickness biopsies were taken from the margins of viable tissue / necrosis areas from all of the flaps and then animals were sacrified. Biopsies were examined under light microscopy and compared for the PMNL and extravasated erytrocyte counts, edema formation in papillary and reticular dermis and new vessel formations.

Results: After the examination and comparison of both groups in terms of the percentage of necrotic areas, less percantage of necrotic areas were observed in group 2. When we compare the laser Doppler recordings, values from the rats in experiment group on postoperative day 7 was less diminished than the experiment group from the preoperative measurements. PMNL and extravasated erythrocyte counts were found to be less abundant whereas new vessel formation were found to be more abundant in histopathologic assessments of the animals in experiment group compared to control group.

Conclusion: In this study, DMOG improved flap viability in rat dorsal peninsula flaps by increasing anjiogenesis and decreasing inflamatory reaction.

Keywords: Flap viability, dimethyloxalylglycine, vascular endothelial growth factor, HIF-1 pathway, angiogenesis.

KAYNAKLAR

1. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg 1987;40:113,141.

2. Kerrigan CL. Skin flap failure: Pathophysiology. Plast Reconstr Surg 72(6): 766-777, 1983.

3. Hentz V. Flap physiology. Ed: Mc Carthy J. Mathes Plastic Surgery. pp. 483-506, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, 2006.

4. Burnstock G, Ralevic V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. Br J Plast Surg 47(8): 527-543, 1994.

5. Daniel R, Kerrigan C. Principle and physiology of skin flap surgery. Ed: Mc Carthy J, Mathes Plastic Surgery. pp. 275-328, Saunders Elsevier, Philadelphia, USA, 1990.

6. Padubidri AN, Browne E, Banbury J, Seimionow M. Arteriovenous cross-flow flap in rats: a novel skin flap. Plast Reconstr Surg 100(5): 1218-1226, 1997.

7. Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. Plast Reconstr Surg 54(5): 585-598, 1974.

8. Kerrigan CL, Daniel RK. Skin flap research: a candid view. Ann Plast Surg 13(5): 383-387, 1984.

9. Kayser M. Surgical flaps. Selected Readings in Plastic Surgery. pp. 9-18, 1999.

10. Hudlicka, O. Angiogenesis. The growth of the vascular system. 1986, London: Academic press.

11. May JW, Jr. Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. Plast Reconstr Surg 61(2): 256-267, 1978.

12. Leek, R.D, A.L. Harris, and C.E. Lewis. Cytokine networks in solid human tumors: Regulation of angiogenesis. J Leukoc Biol, 1994. 56(4): p. 423-35.

13. Colwell AS, Beanes SR, Soo C, Dang C, Ting K, Longaker MT, et al. Increased angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor during scarless repair. Plast Reconstr Surg 115(1): 204-212, 2005.

14. Machens HG, Morgan JR, Berthiaume F, Stefanovich P, Siemers F, Krapohl B, et al. Platelet-derived growth factor-AA-mediated functional angiogenesis in the rat epigastric island flap after genetic modification of fibroblasts is ischemia dependent. Surgery 131(4):393-400, 2002.

15. Dvorak, H.F, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. Am J Pathol, 1995. 146(5): p. 1029-39.

16. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. Br J Plast Surg 53(3): 234-239, 2000.

17. Breen, E.C., et al. Angiogenic growth factor mRNA responses in muscle to a single bout of exercise. J Appl Physiol, 1996. 81(1): p. 355-61.

18. Siegfried, M.R., et al. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. J Pharmacol Exp Ther, 1992. 260(2): p. 668-75.

19. Klagsbrun, M. and P.A. D'Amore. Regulators of angiogenesis. Annu Rev Physiol, 1991. 53: p. 217-39.

20. Wong MS, Erdmann D, Sweis R, Pollmann C, Farrar M, Georgiade GS, et al. Basic fibroblast growth factor expression following surgical delay of rat transverse rectus abdominis myocutaneous flaps. Plast Reconstr Surg 113(7): 2030-2036, 2004.

21. Huang N, Khan A, Ashrafpour H, Neligan PC, Forrest CR, Kontos CD, et al. Efficacy and mechanism of adenovirus-mediated VEGF-165 gene therapy for augmentation of skin flap viability. Am J Physiol Heart Circ Physiol 291(1): 127-137, 2006.

22. Khan A, Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Kontos C, Zhong A, et al. Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: efficacy and mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287(5): 1219-1229, 2004.

23. Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ., 2005.

24. McFarlane RM, De Young G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and prevention. Plastic and Reconstructive Surgery. 1965; 35: 177-182.

25. Myers MB ve Cherry G. Augmentation of survival in pedicle skin flaps by the chemical production of ischemia. Surg Forum. 22:485, 1971.

26. Khouri RK, Angel MF, Edström LE. Standardizing the dorsal rat flap. Surg Forum. 37:590, 1986.

27. Khouri RK, Edström LE, Angel MF. The dorsal rat flap: an appraisal of the model. Surg Forum. 37:598, 1986.

28. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, et al. Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. Ann Surg. 239(6):866-873,2004.

29. Ferrera N, Houck K, Jakeman L, et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. Endocrinology rewiev. 13(1):18-32,1992.

30. Rosen, S.L. Inhibitors of the vascular endothelial growth factor receptor. Heamatol Oncol Clin N Am. 2002: 16; 1173-1187.

31. Shan, N.G., D' Amore, P.A. Therapetic angiogenesis for cardiovascular disease. Curr Control Trials Cardiovasc. Med. 2001: 2(6); 278-285.

32. Hippenstiel S, Krull M, Ikeman A, et al. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. Am J Physiol. 274:L678-84,1998.

33. Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., Walter, P. (in) Histology. The lives and deaths of cells in tissues (eds): Molecular Biology of the Cell. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P Forth Ed. Garland Science, Philadelphia, 2002, pp 1259-1312.

34. Rosen PP, Groshen S, Saigo PE, Kinne DW, Hellman S. Pathological prognostics factors in stage I (T1NOMO) and stage II (T1N1MO) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. J Clin Oncol 1989;7:1239-51.

35. Smart CR, Byrne C, Smith RA, Garfinkel L, Letton AH, Dodd GD, Beahrs OH. Twenty-year follow-up of the breast cancers diagnosed during the Breast Cancer Detection Demonstration Project. CA Cancer J Clin 1997; 47:134-49.

36. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for transcriptional activation. Mol Cell Biol 1992;12:5447–5454.

37. Ann Hoeben, Bart Landuyt et al. Vasculer Endothelial Growth Factor and Angiogenesis. Pharmatological Reviews 2004;56:549-580.

38. Cockman ME, Masson N, Mole DR, Jaakkola P, Chang GW, Clifford SC, Maher ER, Pugh CW, Ratcliffe PJ, Maxwell PH. Hypoxia inducible factor-alpha binding and ubiquitylation by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. J Biol Chem 2000;275:25733–25741.

39. Maxwell PH, Wiesener MS, Chang GW, Clifford SC, Vaux EC, Cockman ME, Wykoff CC, Pugh CW, Maher ER, Ratcliffe PJ. The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. Nature 1999;399::271–275.

40. Ohh M, Park CW, Ivan M, Hoffman MA, Kim TY, Huang LE, Pavletich N, Chau V, Kaelin WG. Ubiquitination of hypoxia-inducible factor requires direct binding to the beta-domain of the von Hippel-Lindau protein. Nat Cell Biol 2000;2:423–427.

41. Fukuda R, Hirota K, Fan F, Jung YD, Ellis LM, Semenza GL. Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. J Biol Chem 2002;277:38205–38211.

42. Jain, R.K. Tumor angiogenezis and accessibility: Role of vascular Endothelial Growth Factor. Seminars in Oncology, 2002: 29(6) Suppl. 16; 3-9.

43. Carmeliet, P., Dor, Y., Jherbert, J.M. et al. Role of HIF1 alfa in hypoxa- mediated apopitosis, cell proliferation and tumor angiogenesis. Nature, 1998: 394; 485-490.

44. Communal, C., Sumandea, M., Tombe, P., Narula, J., Solaro, R.J., Hajjar, R.J.: Functional consequences of caspase activation in cardiac myocytes. PROC. Natl. Acad. Of Sci. 2002: 99 (9); 6252-6256.

45. Aebersold DM, Burri P, Beer KT, Laissue J, Djonov V, Greiner RH, Semenza GL. Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha: a novel predictive and prognostic parameter in the radiotherapy of oropharyngeal cancer. Cancer Res 2001;61:2911–2916.

46. Bachtiary B, Schindl M, Pötter R, Dreier B, Knocke TH, Hainfellner JA, Horvat R, Birner P. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha indicates diminished response to radiotherapy and unfavorable prognosis in patients receiving radical radiotherapy for cervical cancer. Clin Cancer Res 2003;9:2234–2240.

47. Unruh A, Ressel A, Mohamed HG, Johnson RS, Nadrowitz R, Richter E, Katschinski DM, Wenger RH. The hypoxia-inducible factor-1 alpha is a negative factor for tumor therapy. Oncogene 2003;22:3213–3220.

48. Jaakkola P, Mole DR, Tian YM, Wilson MI, Gielbert J, Gaskell SJ, Kriegsheim Av, Hebestreit HF, Mukherji M, Schofield CJ, Maxwell PH, Pugh CW, Ratcliffe PJ.
Targeting of HIF-alpha to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O2-regulated prolyl hydroxylation. Science. 2001 Apr 20;292(5516):468-72. Epub 2001 Apr 5.

49. Eckle, T., D. Ko¨hler, R. Lehmann, K. C. El Kasmi, and H. K. Eltzschig. Hypoxia-inducible factor-1 is central to cardioprotection: a new paradigm for ischemic preconditioning. 2008.Circulation 118: 166–175.

50. Aragone´s, J., P. Fraisl, M. Baes, and P. Carmeliet. Oxygen sensors at the crossroad of metabolism. 2009. Cell Metab. 9: 11–22.

51. Rosenberger, P., J. M. Schwab, V. Mirakaj, E. Masekowsky, A. Mager, J. C. Morote-Garcia, K. Unertl, and H. K. Eltzschig. Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia. 2009. Nat. Immunol. 10: 195–202.

52. Fraisl, P., J. Aragone´s, and P. Carmeliet. Inhibition of oxygen sensors as a therapeutic strategy for ischaemic and inflammatory disease. 2009. Nat. Rev. Drug Discov. 8: 139–152.

53. Milkiewicz, M., Pugh, C. Inhibition of endogenous HIF inactivation induces angiogenesis in ischaemic skeletal muscles of mice. 2004 J. Physiol. 560, 21–26.

54. Cummins EP, Seeballuck F, Keely SJ, Mangan NE, Callanan JJ, Fallon PG, Taylor CT. The hydroxylase inhibitor dimethyloxalylglycine is protective in a murine model of colitis. 2008 Gastroenterology 134:156–65.

55. Bruick RK, McKnight SL. A conserved family of prolyl-4-hydroxylases that modify HIF. Science. 2001 Nov 9;294(5545):1337-40. Epub 2001 Oct 11.

56. Ivan M, Kondo K, Yang H, Kim W, Valiando J, Ohh M, Salic A, Asara JM, Lane WS, Kaelin WG Jr. HIFalpha targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O2 sensing. Science. 2001 Apr 20;292(5516):464-8. Epub 2001 Apr 5.

57. Kryger Z, Zhang F, Dogan T, Cheng C, Lineaweaver WC, Buncke HJ. The effects of VEGF on survival of a random flap in the rat: examination of various routes of administration. Br J Plast Surg. 2000 Apr;53(3):234-9.

58. Tyner TR, Tong W, Donovan K, McDonald T, Sian K, Yamaguchi KT. Dichloroacetate reduces tissue necrosis in a rat transverse rectus abdominis musculocutenous flap model. Ann Plast Surg. 2006 Mar;56(3):320-6.

59. Ersoy A, Sevin K, Sevin A, Serel S. Effects of clopidogrel on survival of rat skin flaps. J Plast Reconstr Aesthet Surg. 2007;60(8):861-3. Epub 2007 Apr 5.

60. Ulusoy MG, Uysal A, Koçer U, Karaaslan O, Cuzdan SS, Ayyildiz A, Ustün H. Improved flap viability with site-specific delivery of sildenafil citrate using fibrin glue. Ann Plast Surg. 2005 Sep;55(3):292-6.

61. Kayser M. R. M.D. Surgical flaps. Selected Readings in Plastic Surgery. Vol 9, number 2, 1999.

62. Vedder N. B. M.D. Flap Physiology. Mathes S. J. M.D. (Eds.), Plastic Surgery. 2th edition. Saunders Elsevier, Philadelphia, 483-506, 2006.

63. Erdem I. Kranial pediküllü dorsal rat flebinde mikronize flavonoid fraksiyonunun distal flep nekrozuna etkisi. T.C. Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.B.D. Uzmanlık tezi. Diyarbakır-1998.

64. Payette J. R. B.S., Kohlenberg E., Leonardi L. Ph.D., Pabbies A. M.D., Kerr P. M.D., Liu K. Ph.D., and Sowa M. G. Ph.D. Assessment of skin flaps using optically based methods for measuring blood flow and oxygenation. Plast. Reconst. Surg. 115; 539-546, 2005.

65. Meirer R., Kamelger F. S., Huemer G. M., Wanner S., Piza-Katzer H. Extracorporal shock wave may enhance skin flap survival in an animal model. The British Association of Plastic Surgeons. 58; 53-57, 2005.

.

66. Askar I., Sabuncuoglu B. T., Sevin K., Saray A. Etofenamat n random paternli sıçan dorsal deri flebi ya ayabilirli i üzerine etkisi: deneysel çal ma. Journal of Inonu University Faculty. Vol 7, No 4, 2000.

67. Olivas TP, Saylor TF, Wong HP, Stephenson LL, Zamboni WA. Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. Plast Reconstr Surg 107(3): 785-788, 2001.

68. Kargi E, Babuccu O, Hosnuter M, Payasli C, Ayoglu F. [The effect of combined use of vitamin C, vitamin E, and ibuprofen on flap viability: an experimental study]. Kulak Burun Bogaz Ihtis Derg 14(5-6): 116-120, 2005.

69. Dvali LT, Dagum AB, Pang CY, Kerluke LD, Catton P, Pennock P, et al. Effect of radiation on skin expansion and skin flap viability in pigs. Plast Reconstr Surg 106(3): 624-629, 2000.

70. Khan A, Ashrafpour H, Huang N, Neligan PC, Kontos C, Zhong A, et al. Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability: Efficacy and mechanism. Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol 287(5): 1219-1229, 2004.

71. Hart K, Baur D, Hodam J, Lesoon-Wood L, Parham M, Keith K, et al. Short- and longterm effects of sildenafil on skin flap survival in rats. Laryngoscope 116(4): 522-528, 2006.

72. Ercocen AR, Apaydin I, Emiroglu M, Gultan SM, Ergun H, Yormuk E. The effects of L-arginine and iloprost on the viability of random skin flaps in rats. Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 32(1): 19-25, 1998.

73. Pickens JP, Rodman SM, Wetmore SJ. The effects of extended perioperative pentoxifylline on random skin flap survival. Am J Otolaryngol 15(5): 358-369, 1994.

74. Gurunluoğlu R, Özer K, Skugor B, et al. Gene therapy with adenovirus-mediated VEGF enhances skin flap prefabrication. Microsurgery. 25(5):433-41,2005.

75. Pang Y, Lineaweaver WC, Lei MP, et al. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor ımprovement of ischemic flap survival in rats. Plast Reconstr Surg 112(2):556-564,2003.

76. Ferrera N, Houck K, Jakeman L, et al. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. Endocrinology rewiev. 13(1):18-32,1992.

77. Zhang F, Richards L, Angel MF, et al. Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. Br J Plast Surg 55:59-63,2002.

78. Zhang F, Oswald T, Lin S, et al. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression and the effect of exogenous VEGF on survival of a random flap in the rat. Br J Plast Surg 56:653-659,2003.

79. Clauss M, Gerlach M, Gerlach H, et al. Vascular permeability factor: a tumor-derived polypeptide that induces endothelial cell and monocyte procoagulant activity, and promotes monocyte migration. J Exp Med. 1;172(6):1535-45, 1990.

80. Zhang F, Yang F, Hu EC, Sones W, Lei M, Lineaweaver WC. Vascular endothelial growth factor gene therapy in improvement of skin paddle survival in a rat TRAM flap model. J Reconstr Microsurg 21(6): 391-396, 2005.

81. Nagel S, Papadakis M, Chen R, Hoyte LC, Brooks KJ, Gallichan D, Sibson NR, Pugh C, Buchan AM. Neuroprotection by dimethyloxalylglycine following permanent and transient focal cerebral ischemia in rats. J Cereb Blood Flow Metab. 2011 Jan;31(1):132-43. Epub 2010 Apr 21.

82. Zhao HX, Wang XL, Wang YH, Wu Y, Li XY, Lv XP, Zhao ZQ, Zhao RR, Liu HR. Attenuation of myocardial injury by postconditioning: role of hypoxia inducible factor-1alpha.

83. Asikainen TM, Schneider BK, Waleh NS, Clyman RI, Ho WB, Flippin LA, Günzler V, White CW. Activation of hypoxia-inducible factors in hyperoxia through prolyl 4-hydroxylase blockade in cells and explants of primate lung. Proc Natl Acad Sci U S A. 2005 Jul 19;102(29):10212-7. Epub 2005 Jul 11.

84. Ockaili R, Natarajan R, Salloum F, Fisher BJ, Jones D, Fowler AA 3rd, Kukreja RC (2005) HIF-1 activation attenuates postischemic myocardial injury: role for heme oxygenase-1 in modulating microvascular chemokine generation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 289:542–548.

85. Semenza GL (2004) Hydroxylation of HIF-1: Oxygen sensing at the molecular level. Physiology (Bethesda) 19:176–182.

86. Wang GL, Jiang BH, Rue EA, Semenza GL (1995) Hypoxia inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O2 tension. Proc Natl Acad Sci 92:5510–5514.

87. Rey S, Lee K, Wang CJ, Gupta K, Chen S, McMillan A, Bhise N, Levchenko A, Semenza GL. Synergistic effect of HIF-1alpha gene therapy and HIF-1-activated bone marrow-derived angiogenic cells in a mouse model of limb ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009 Dec 1;106(48):20399-404. Epub 2009 Nov 30.

88. Rehman J, Li J, Orschell CM,March KL. Peripheral blood ‘‘endothelial progenitor cells’’ are derived from monocyte/macrophages and secrete angiogenic growth factors. (2003) Circulation 107:1164–1169.

89. Natarajan R, Salloum FN, Fisher BJ, Smithson L, Almenara J, Fowler AA 3rd. Prolyl hydroxylase inhibition attenuates post-ischemic cardiac injury via induction of endoplasmic reticulum stress genes. Vascul Pharmacol. 2009 Aug-Sep;51(2-3):110-8. Epub 2009 Jun 11.

90. Carmeliet P. Angiogenesis in health and disease. Nat Med. 2003 Jun;9(6):653-60.

91. Elvert G, Kappel A, Heidenreich R, Englmeier U, Lanz S, Acker T, Rauter M, Plate K, Sieweke M, Breier G, Flamme I. Cooperative interaction of hypoxia-inducible factor-2alpha (HIF-2alpha) and Ets-1 in the transcriptional activation of vascular endothelial growth factor receptor-2 (Flk-1). J Biol Chem. 2003 Feb 28;278(9):7520-30. Epub 2002 Dec 2.

92. Milkiewicz M, Hudlicka O, Verhaeg J, Egginton S, Brown MD. Differential expression of Flk-1 and Flt-1 in rat skeletal muscle in response to chronic ischaemia: favourable effect of muscle activity. Clin Sci (Lond). 2003 Oct;105(4):473-82.

93. Takahashi T, Shibuya M. The 230 kDa mature form of KDR/Flk-1 (VEGF receptor-2) activates the PLC-gamma pathway and partially induces mitotic signals in NIH3T3 fibroblasts. Oncogene. 1997 May 1;14(17):2079-89.

94. Shen X, Wan C, Ramaswamy G, Mavalli M, Wang Y, Duvall CL, Deng LF, Guldberg RE, Eberhart A, Clemens TL, Gilbert SR. Prolyl hydroxylase inhibitors increase neoangiogenesis and callus formation following femur fracture in mice. J Orthop Res. 2009 Oct;27(10):1298-305.

95. Melanie L. Hart, Almut Grenz, Iris C. Gorzolla, Jens Schittenhelm, Julee H. Dalton and Holger K. Eltzschig Hypoxia-Inducible Factor-1a-Dependent Protection from Intestinal ischemia/Reperfusion Injury Involves Ecto-5¢-Nucleotidase (CD73) and the A2B Adenosine Receptor. J Immunol 2011;186;4367-4374; Prepublished online 28 February 2011.

96. Bru¨ne B, Zhou J (2007) Nitric oxide and superoxide: interference with hypoxic signaling. Cardiovasc Res 75:275–282.

97. Haroon ZA, Amin K, Jiang X, Arcasoy MO (September 2003). "A novel role for erythropoietin during fibrin-induced wound-healing response". Am. J. Pathol. 163 (3): 993–1000. PMC 1868246. PMID 12937140.

98. Siren AL et al. (2001). "Erythropoietin prevents neuronal apoptosis after cerebral ischemia and metabolic stress". Proc Natl Acad Sci USA 98 (7): 4044–4049. doi:10.1073/pnas.051606598. PMC 31176. PMID 11259643.

99. Loenarz C, Schofield CJ. Expanding chemical biology of 2-oxoglutarate oxygenases. Nat Chem Biol. 2008 Mar;4(3):152-6.

100. De Muinck ED, Simons M. Re-evaluating therapeutic neovascularization. J Mol Cell Cardiol. 2004 Jan;36(1):25-32. Review.

101. Lomb DJ, Desouza LA, Franklin JL, Freeman RS. Prolyl hydroxylase inhibitors depend on extracellular glucose and hypoxia-inducible factor (HIF)-2alpha to inhibit cell death caused by nerve growth factor (NGF) deprivation: evidence that HIF-2alpha has a role in NGF-promoted survival of sympathetic neurons. Mol Pharmacol. 2009 May;75(5):1198-209. Epub 2009 Feb 9.