

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

TROMBOSİT ZENGİN PLAZMANIN PEDİKÜLLÜ FLEPLERDE
PEDİKÜL AYIRMA ZAMANINA VE GECİKTİRME (DELAY)
FENOMENİNE ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. FULYA FINDIKÇIOĞLU

TEZ DANIŞMANI
DOÇ. DR. REHA YAVUZER

ANKARA-2006

ÖNSÖZ

Bana ve diğer tüm asistan arkadaşlarıma plastik ve rekonstrüktif cerrahi sanatını sabır ve özveriyle, sevdirecek öğreten, tecrübelerinden bizim en iyi şekilde faydalanmamız için elinden gelen tüm gayreti sarf eden, çalışkanlık ve azmiyle hepimize örnek olan değerli hocam Doç. Dr. Reha Yavuzer'e,

Eğitimime önemli katkıları olan; destek ve ilgilerini esirgemeyen Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof. Dr. Osman Latifoğlu'na, Sayın Prof. Dr. Cemalettin Çelebi'ye, Sayın Prof. Dr. Kenan Atabay'a, Sayın Prof. Dr. Seyhan Çenetoğlu'na, Sayın Doç. Dr. Sühan Ayhan'a, Sayın Yrd. Doç. Dr. Selahattin Özmen'e, Sayın Uzm. Dr. Serhan Tuncer'e, tezimin hazırlık aşamasında büyük bir özveriyle yardımcı olan Dr. Kemal Fındıkçioğlu'na, Dr. Onur Çukurluoğlu'na ve Dr. Başar Kaya'ya, Cerrahi Araştırma Laboratuvarı'nın olanaklarından faydalanmamı sağlayan GÜ Deney Hayvanları Laboratuvarı ve Cerrahi Komisyonu üyelerine, çalışmamın histolojik değerlendirmesini yapan Sayın Prof. Dr. Suna Ömeroğlu'na ve Sayın Uzm. Dr. Neşe Lortlar'a, Trombosit Zengin Plazma ve Fibrin Yapıştırıcı hazırlanabilmesi için GÜ Kan Bankasının imkanlarını sunan Çocuk Sağlığı Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Doç. Dr. İdil Yenicesu'ya, radyolojik inceleme konusundaki yardımlarından dolayı Radyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Sayın Prof. Dr. Ayşegül Özdemir'e, istatistiksel incelemelerde yardımlarından dolayı Dr. Elif Durukan'a, GÜ Tıp Fakültesi Laboratuar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırma Merkezinde çalışmam boyunca hiçbir konuda yardımını esirgemeyen Sayın Vet. Dr. Şeyda Diker ve özveriyle çalışan tüm teknisyenlere, desteklerini her zaman arayacağım araştırma görevlisi arkadaşlarıma,

Eğitimim konusunda ve hayatın her alanında bana verdikleri destek ve yardımlarından dolayı sevgili eşime ve aileme, **sonsuz teşekkürlerimi sunuyorum.**

İÇİNDEKİLER

SAYFA NO

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	
a. Flep tanımı ve sınıflandırması	4
b. Tarihçe	5
c. Flep kanlanması	7
d. Flep fizyopatolojisi	11
e. Pedikül ayırma zamanı	14
f. Geciktirme fenomeni	15
g. Fibrin yapıştırıcı	22
h. Trombosit zengin plazma	24
i. Kasık flebinin anatomisi	37
j. Karın flebinin anatomisi	39
III. GEREÇ VE YÖNTEM	42
IV. BULGULAR	58
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	76
VI. ÖZET	85
VII. İNGİLİZCE ÖZET	87
VIII. KAYNAKLAR	88

I. GİRİŞ

Travma, tümör rezeksiyonları, yanıklar vb. sonucu oluşmuş pek çok geniş doku defektinin kapatılması, greftlerden serbest fleplere kadar uzanan geniş bir yelpazede gerçekleştirilmektedir. Flep, kendi intravasküler dolaşımıyla yaşarken, verici bir bölgeden alıcı bir bölgeye aktarılabilen bir doku ünitesidir.⁷⁹ Kapatılacak defektin ve verici bölgenin özellikleri göz önüne alınarak çeşitli flepler kullanılabilir (cilt, kas, fasya veya kompozit). Flep cerrahisinin başarısı flep yaşayabilirliği ile paralel gitmektedir ve bu nedenle kısmi ya da tam kayıplar halen plastik cerrahinin önemli bir problemi olmaya devam etmektedir.^{66,123} Bu istenmeyen kayıpları azaltabilmek amacıyla hastanın, defektin, verici bölgenin durumları ve cerrahi şartlar ideale getirilmeye çalışılmıştır. Pediküllü fleplerin tanımlanmasından sonra araştırmacılar pedikül ayırma zamanıyla ilgili pek çok deneysel ve klinik çalışmalar yapmış hastanın hastanede yatış süresini ve maliyeti azaltıp konforunu arttırmak için pedikül ayırma süresini minimuma indirmeye çalışmışlardır.^{40,55,115,153}

Tagliacozzi'den sonra nekrozu önlemek amacıyla flepte bazı vasküler yapılar kesilerek geciktirme işlemi uygulanmaya başlanmıştır. Fakat, geciktirme fenomeninin etki mekanizması tam olarak anlaşılamadığı için pek çok farklı mekanizma üzerinden flep yaşayabilirliğini arttırmaya yönelik çalışmalar yapılmaktadır ve henüz ideal bir sonuca ulaşılamamıştır.¹⁰³ Günümüzde mikrocerrahide komplikasyon oranları azaldığı için serbest doku aktarımları daha popüler hale gelmiştir. Fakat geciktirme işlemi pediküllü veya serbest fleplerin alanını genişletmek ve nekrozu önleyebilmek için halen destekleyici girişim olarak önemini korumaktadır. Cerrahi geciktirme işlemi, hem hastanın daha uzun süre hastane bakımına bağımlı hale gelmesi nedeniyle iş gücü kaybına, hem de birden fazla ameliyat gerekmesi nedeniyle maliyet artışına neden olmaktadır. Bu nedenlerle maksimum flep

yaşayabilirliğini sağlayabilecek daha az girişimsel bir geciktirme işlemi bulunmasına yönelik deneysel çalışmalar devam etmektedir,^{2,3,43,77} ancak şu ana kadar flep yaşayabilirliğini arttırmak için klinik olarak tanımlanmış en etkili yöntem cerrahi geciktirmedir. Bu işlemin patofizyolojisini açıklamaya yönelik yapılmış çok sayıda çalışma neticesinde pek çok teori öne sürülmüştür. Flebin hipoksik ortama alıştırılması, sempatik sinirlerin kesilmesi ile gelişen hipersensitivite, hiperadrenerjik durumun düzeltilmesi, yeni damar oluşumu ve damarların yeniden düzenlenmesi bu teorilerdendir.^{38,72,106,131}

Taylor ve Palmer 1987’de yaptıkları çalışmadan sonra “choke” (boğulmuş) damarlarını tanımlamışlar ve “anjiozom” konseptini kurmuşlardır. Daha sonraki çalışmalarda, geciktirme işleminden sonra choke damarlarda ve komşuluğundaki alanın vasküler ağında kalıcı ve geri dönüşümsüz bir dilatasyon gözlenmiştir. Çeşitli araştırmacılar aynı mekanizmayı farmakolojik olarak geliştirmeyi hedeflemişler ve çeşitli vazodilatör ajanlarla kimyasal geciktirme yoluna gitmişlerdir.^{1,2,3,38} Subdermal pleksustaki damarlarda hasar oluşturarak hipoksik ortam oluşmasını ve reaktif vazodilatasyon sağlamayı amaçlayan bazı çalışmacılar da lazer ile bunu başarmaya çalışmışlardır.^{2,3} Yine bir grup araştırmacı damarlanmayı arttırarak flep dolaşımına katkı sağlayabilecekleri düşüncesinden hareketle anjiojenik büyüme faktörlerini kullanmışlar ve çelişkili sonuçlar yayınlamışlardır.⁶⁷

Trombosit zengin plazma Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü (VEGF), Trombosit Kaynaklı Büyüme Faktörü (PDGF), Transforming Büyüme Faktörü α ve β (TGF α ve β), Epidermal Büyüme Faktörü (EGF), Fibroblast Büyüme Faktörü (FGF), İnsülin Benzeri Büyüme Faktörü (IGF) vb büyüme faktörlerini içeren ve kanın farklı iki frekansta santrifüj edilmesiyle oluşan bir maddedir. Elde edilen plazmadaki trombosit miktarı normal plazmadakinin 3-8 katıdır. Bu ürüne trombin ilavesiyle trombositlerin α - granüllerinden çok

sayıda mediatör salınır. Bunların hemen hepsi yara ve kemik iyileşmesinde görev alan ve anjiogenez üzerinde de etkili olan mediatörlerdir.^{11,32,51,70,89,91,98} Trombosit jel, platelet zengin plazma, platelet jel gibi değişik isimlerle bazı çalışmalarda rastladığımız trombosit zengin plazma teorik olarak, yukarıdaki faktörleri içerdiği göz önüne alındığında paha biçilmez bir üründür. Bunun yanında otolog olarak üretilebiliyor olması son yıllarda özellikle kemik iyileşmesinde ve zor iyileşen yaraların tedavisinde klinik kullanım alanı bulmasına sebep olmuştur. Yapılan klinik çalışmalarda yara ve kemik iyileşmesini hızlandırdığı; şişliği, ağrıyı, enfeksiyonu ve skarı azalttığı, kanama kontrolü sağladığı iddia edilmektedir.^{32,85,86,98,100,105,154}

Otolog üretilebiliyor olması nedeniyle yeterli hayvan deneyi yapılmadan klinikte kullanıma giren bu ürün, teorik olarak çok şey vaat etmesine rağmen; yeterli kontrollü çalışma olmaması nedeniyle hala sonuçları konusunda şüphe uyandırmaktadır. Literatürde konuyla ilgili deneysel çalışmaların eksikliği dikkati çekmektedir.

Bu tez çalışmasında amacımız, trombosit zengin plazmanın içerdiği büyüme faktörleri vasıtasıyla anjiogenezisi arttırdığı düşüncesinden yola çıkarak, sıçanlardaki süperfisiyal inferior epigastrik pediküllü fleplerde, klinikte yaklaşık 10-14 gün olan pedikül ayrılma zamanına etkisini araştırmayı amaçladık. Çalışmanın ikinci basamağında, bu ürünün geciktirme (delay) fenomeni üzerine etkilerini incelemeyi ve cerrahi geciktirmeye kimyasal bir alternatif sunabilmeyi amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

A. FLEP TANIMI VE SINIFLANDIRMASI

Flepler, vasküler beslenmesi korunarak, bir bölgeden başka bir bölgeye taşınabilen doku parçalarıdır ve vücudun tüm bölgelerindeki defektlerde kullanılabildikleri için rekonstrüksiyon cerrahisinde oldukça geniş bir bölümü oluşturmaktadırlar.

Flepler, kanlanma kaynağı, flebi oluşturan dokuların kompozisyonu, aktarılma şekilleri ve yerlerine göre sınıflandırılabilirler.^{36,60}

1) Kanlanma kaynağına göre

a) Random flep

b) Aksiyel flep

2) Flebin doku içeriğine göre

a) Deri flepleri (kutanöz)

b) Kas flepleri (muskuler)

c) Fasya flepleri

d) Kompozit doku flepleri (muskulokütan, fasyokütan, osseomuskulokütan vb.)

3) Flep aktarımının şekline ve yerine göre

A) Lokal flepler

a) İlerletme flepleri (Advancement)

b) Rotasyon flepleri

c) Transpozisyon flepleri

B) Uzak flepler

- a) Direkt flepler
- b) Tüp flepler
- c) Serbest flepler

B. TARİHÇE

“Flep” kelimesi, aslı Flemenkçe olan “flappe” kelimesinden türemiş olup ‘gevşek ve geniş bir şekilde asılmış, sadece bir tarafından tutan’ anlamına gelmektedir. Fleplerle yapılan doku onarımlarının tarihi milattan önce 600’lü yıllarda Sushruta Samita’nın gerçekleştirdiği yanak flebi ile burun onarımına kadar gitmektedir. En erken flepler baş-boyun ve alt ekstremité bölgelerinde muhtemelen random paternli diyebileceğimiz şekilde dizayn edilmiş fleplerdi. 1597’de Tagliacozzi’nin distal bazlı kol flebiyle burun rekonstrüksiyonu yapmasından sonra, 19. yüzyılda İngiliz cerrah Carpue başarılı alın flepleri uygulayana kadar rekonstrüksiyon cerrahisi duraklama dönemine girdi. Bundan sonra flep evrimi 1. ve 2. Dünya savaşlarının da katkısıyla oldukça hızlı bir şekilde gerçekleşti. Yirminci yüzyılın başlarında dikkatler random tüp flepler üzerine çevrildi ve bu fleplerin yaşayabilirliğini arttırmak için geciktirme işlemi uygulanmaya başlandı. Carl Manchot’un 1889’da belli damarlar tarafından beslenen anatomik deri bölgeleri kavramını yayınlamasından sonra 1919’da Davis aksiyel, pediküllü kas ve fasya fleplerini ve kompozit flepleri tanımlandı. Bundan sonra 1950 ve 1960’larda Owens, McGregor, Bakamjian, vb. araştırmacılar tarafından saçlı deri, alın, boyun, göğüs öndüvarı ve supraklavikuler bölgede pek çok aksiyel paternli flep tanımlandı. Orticochea’nın 1970’lerin başında aynı muskulokütan perforatör damarlar tarafından beslenen

deri adası ve kas dokusu varlığını rapor etmesinden sonra kas ve muskulokütan flepler popülerize oldu ve 1980'lere doğru serbest doku aktarımı gündeme geldi. 1981'de Ponten'in belli bir deri adasının beslenmesini sağlayan septokütan perforatörleri fark etmesi fasyokütan flep kavramının gelişmesine yol açtı.^{30,79} Taylor ve Palmer 1987'de "anjiozom (angiosome)" kavramını tanımlayarak flep cerrahisine büyük katkıda bulunmuşlardır. Anjiozom, tek bir kaynak arter tarafından beslenmesi sağlanan deri, deri altı ve derin doku kompozit (bileşik) ünitesidir. Vücudu oluşturan pek çok anjiozom arasında çapları değişebilen "choke" anastomotik damarları da bu araştırmacılar tarafından tanımlanmıştır.^{148,149}

Dhar ve Taylor'ın yaptığı deneysel çalışmada geciktirme işlemi sırasında "choke" damar dilatasyonunun kalıcı ve dönüşümsüz bir şekilde gerçekleşip, damar çapında artışla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu sonuçların elde edilmesinden sonra geciktirme işleminin sadece cerrahi olarak değil çeşitli farmakolojik ajanlarla (rezerpin, 6-OH dopamin, guanetidin, fenoksibenzamin, fentolamin) yapılabileceği düşüncesi ortaya çıkmıştır. Yapılan çalışmalarda, bu ilaçlarla flep canlılığının arttığı gösterilse de geciktirme için halen en kabul edilir sonuçlar cerrahi geciktirmeyle alınmaktadır.¹²³

Teknolojideki gelişmeler sayesinde mikrocerrahi gerektiren serbest doku aktarımlarının daha düşük başarısızlık oranlarıyla yapılır olması nedeniyle eskiden tercih edilen basitten karmaşığa doğru giden rekonstrüksiyon merdiveni kullanımı yerine, 1997'de rekonstrüksiyon üçgeni tanımlanarak, ideal form ve fonksiyona ulaşmak için cerrahın transpozisyon flebi, serbest doku aktarımı veya doku genişletme işlemlerinden istediği herhangi birini seçebileceği belirtildi.^{30,79,103}

Rekonstrüksiyon cerrahının bu tercihi doğru ve yerinde yapabilmesi için elbette öncelikle flep kanlanmasını ve fizyolojisini bilmesi gerekmektedir.

C. FLEP KANLANMASI

Çok eskiden beri flep cerrahisi yapılmasına rağmen bu fleplerin hangi damarlardan baz aldığı konusunda kesin bir bilgi yoktu. Bu konudaki ilk detaylı incelemeler Manchot tarafından 1889'da yapılmış ve kutanöz damarsal bölgeler tariflenmiştir. Bundan kısa bir süre sonra dermal ve subdermal tabakaları Spalteholz anatomik olarak Braithwaite ise fonksiyonel olarak göstermiştir. Salmon yaptığı çalışmayla vücutta 80 tane kanlanma bölgesi tariflemiş bunlara ilave olarak perforatörler arasında bazı bağlantılar olduğunu belirtmiştir.⁷⁹

Daniel ve Williams deri fleplerinin makrosirkülasyonunun segmental, anastomotik ve aksiyel damarlar olmak üzere üç kaynaktan geldiğini, perforatör damarların ise segmental arterlerden dallanarak kasları beslediğini söylemişlerdir.⁷⁹ Bu yazarlar flepleri kutanöz, arteriyel ve ada flepleri olarak; aynı dönemde McGregor ve Morgan flepleri random ve aksiyel flepler olarak sınıflandırmışlardır. Diğer bazı yazarlar random fleplerle kutanöz flepleri aynı başlık altında toplamışlardır fakat aslında ikisi birbiri yerine kullanılmaması gereken kavramlardır.³⁶

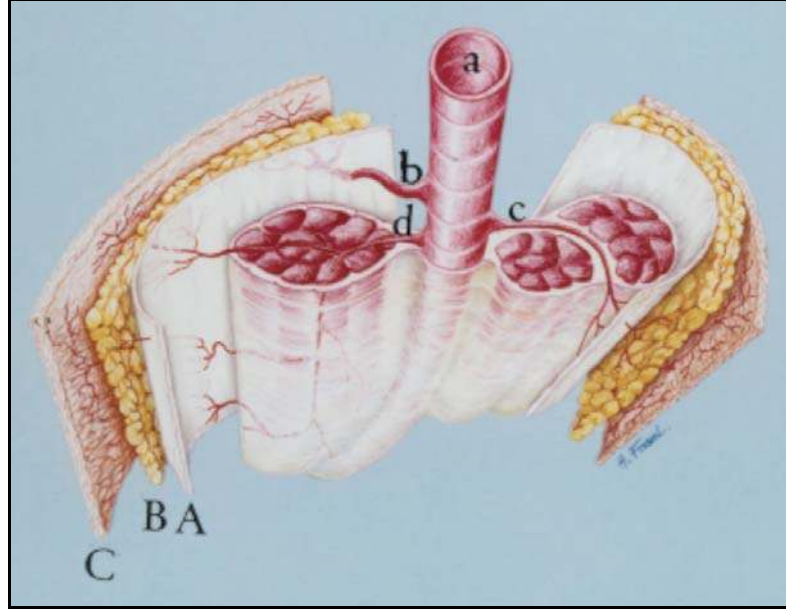
Daha sonra Daniel ve Kerrigan ada fleplerinin arteriyel flepler olduğunu söyleyerek direk kutanöz ve muskulokutanöz olarak yeniden sınıflamışlardır. Damarların fasyal planları takip ettiği anlaşıldıktan sonra 1980'lerde fasyokutan flep modeli geliştirilmiş ve kutanöz dolaşım konusunda yeni terimler (aksiyel, random, direk kutanöz, muskulokutanöz, fasyokutanöz, septokutanöz ve perforatör gibi.) ortaya çıkmıştır.^{30,36,79}

Cormack ve Lamberty, anatomik, dinamik ve potansiyel alan olarak adlandırılan üç tip kutanöz damar alanı tanımlamışlardır.^{30,31,79} **Anatomik alan**, tek bir damar tarafından

çevredeki damarlarla anastomoz yapmadan beslenip yaşayabilen alandır. **Dinamik alan**, arteriyoler anastomozların intravasküler basınç değişimleri sayesinde beslenen bölümünü, **potansiyel alan** ise komşu bir arter alanını da içeren deri adası ile birlikte yaşayabilen flep alanını anlatır ve yaşayabilirliğini arttırmak geciktirme işlemi ile mümkün olabilir. Bu çalışmaların ışığında bir flebin perfüzyonunu sağlayan arterlerin hedeflerine üç yoldan ulaşabildiği bildirilmiştir (**Şekil 1**).^{30,31,65,79,103}

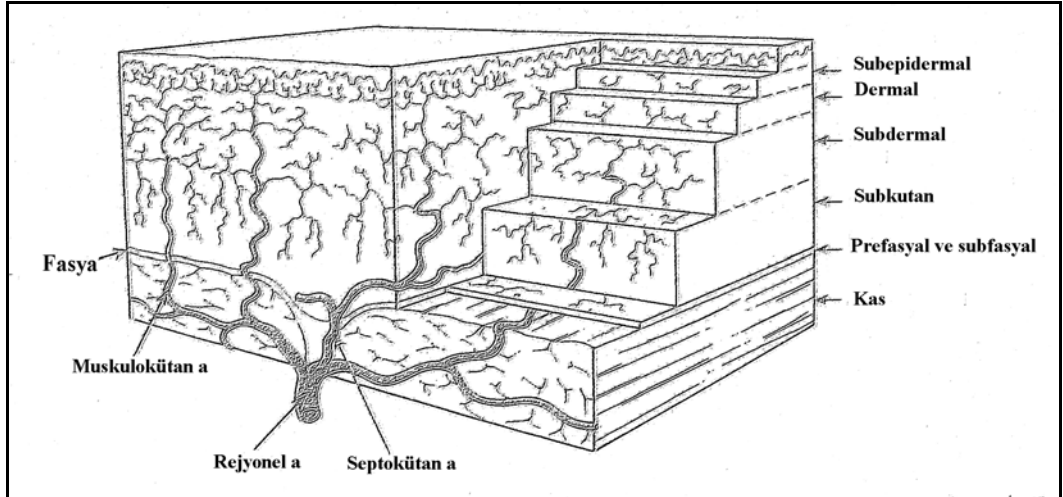
1. **Muskulokütanöz arter:** Deri ve subkutan doku bloğunun altındaki kastan dik olarak çıkarak bu bölgeyi besleyen damardır
2. **Septokutanöz arter:** Segmental veya muskulokütanöz damarlardan köken alıp intermuskuler fasyal septadan direk olarak geçip cilde ulaşan damardır
3. **Direkt kutanöz arter:** Subkutan yağ içinde kas ve fasyanın hemen üstünde cilde paralel bulunan doğrudan cilde uzanan arterdir

Bu damarlar fasya, subkutan doku ve deride beş vasküler pleksus oluşturarak kanlanmayı sağlarlar: fasyal, subkutan, subdermal, dermal ve subepidermal pleksus (**Şekil 2**).



Şekil 1: Subkutan damar ağı. A. Derin fasya B. Süperfisiyal fasya C. Deri; a. Kaynak arter b. Direk kutanöz arter c. Septokutanöz arter d. Muskulokutanöz arter.

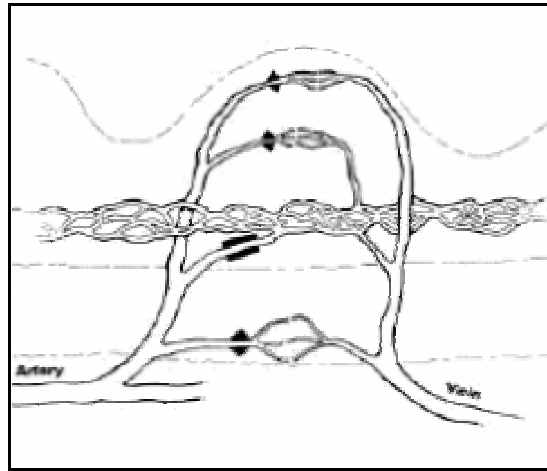
(Gumener R, Montandon D: Distally based forearm fasciosubcutaneous flap: Discussion. Plast Reconstr Surg 114(2): 397-399, 2004)



Şekil 2: Deri dolaşımı. (Mathes SJ, Nahai F: Reconstructive Surgery: Principles, Anatomy and Technique. New York, Churchill Livingstone, 1997.)

Taylor ve Palmer yaptıkları kadavra ve hayvan çalışmaları sonucunda tek bir kaynak arter tarafından kanlanması sağlanan deri, deri altı ve daha derin dokuları kapsayan kompozit doku blokları bulunduğunu göstermiş ve bunları anjiozom olarak adlandırmıştır. Bu arteriyel sistemler arasında daha küçük çaplı arter ve arterioller aracılığıyla oluşan anastomozlar mevcuttur ve bunlara “choke” damarlar denir. Bir pedikülün kendi beslediği anjiozoma ilave olarak komşu anjiozomların bir kısmını da “choke” damarlar vasıtasıyla besleyebileceği iddia edilmişse de, McGregor’un hastalar üzerinde yaptığı “fluorescein” enjeksiyon çalışmalarında “fluorescein” dağılımı Taylor ve Palmer’in çalışmasında gösterilenden daha küçük alanlara olmuş ve komşu iki bölge arasında “watershed” denilen bölge, anjiozom kenarında tarif edilmiş olan “choke” arter bölgesiyle uyuşmamıştır.^{148,149}

Makrosirkülasyonun anatomisi bir flebi tariflemek ve dizayn etmek için kullanılmıştır. Fakat flep boyunca oksijen ve besin sağlanmasının karbondioksit ve atık madde taşınmasının, bir diğer deyişle hücrel metabolizmanın gerçekleştiği yer mikrosirkülatuar yataktır. Mikrosirkülatuar yatakta arterioller, kapillerler, venüller ve arteriovenöz anastomozlar mevcut olup, perfüzyon kontrolünün çoğu bu alanda gerçekleşir (**Şekil 3**).³¹



Şekil 3: Derinin mikrosirkülasyonu

Kutanöz kan akımının kontrolü lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede gerçekleşir. Sistemik kontrol nöral ve hümorale regülasyonla sağlanır. Dominant olan nöral regülasyon primer olarak vazokonstriksiyona neden olan sempatik lifler ve deride en fazla bulunan α -adrenerjik reseptörler yoluyla gerçekleşir. B-adrenerjik reseptörlerin uyarılması vazodilatasyonla, arteriovenöz anastomozlardaki serotonerjik reseptörlerin uyarılması vazokonstriksiyonla sonuçlanır. Bunların hepsi beraber, arteriol ve arteriovenöz anastomozlar seviyesinde vasküler düz kas tonusunun kontrolünü gerçekleştirir. Hümorale regülasyon sistemik vazoaktif maddelerin kendilerine özgü reseptörleri üzerinden etki göstermeleriyle olur. Örneğin epinefrin ve norepinefrin α -adrenerjik reseptörleri etkiler. Vazokonstriksiyona neden olan diğer maddeler serotonin, tromboksan A_2 ve Prostaglandin $F_{2\alpha}$ dır. Vazodilatör olanlar Prostaglandin E_1 , Prostaglandin I_2 , histamin, bradikinin, Lökotrien C_4 ve D_4 tür. Lokal seviyede deri kan dolaşımını etkileyen metabolik faktörler; tamamı vazodilatör olarak etki eden hiperkapni, hipoksi ve asidozdur. Artmış doku perfüzyon basıncı, hipotermi ve hipertermi de regülasyonda görev alan fiziksel faktörlerdir.^{31,79,103}

D. FLEP FİZYOLOJİSİ

Flep kaldırma işlemi, dokuya olan kan akımını kontrol eden hassas dengeyi bozar ve büyük değişikliklere neden olur. Flep kaldırıldığı anda sempatik inervasyonun kaybolması nedeniyle vazokonstriktör nörotransmitterler salınır. Buna flep kesileri nedeniyle damar bağlantılarının kesilmesi sonucu azalan perfüzyon basıncı da eklenince flebin periferale kesimleri iskemik hale gelir. Bu bölgenin yüzde kaçının yaşayacağı ilk 24 saat içinde mikrosirkülasyon düzeyinde olan olaylara, yani besleyici kapiller kan akımı değişikliklerine

bağlıdır. Sasaki ve Pang domuzlarda yaptıkları random flep deneylerinde kapiller kan akımı 0,01 ml/dak/gr'dan az olan flep uç bölgelerinin yaşamadığını göstermişlerdir.^{112,137}

Flep kaldırılması işlemi sonrası gelişen hemodinamik, anatomik ve metabolik değişiklikleri gösterebilmek için çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Palmer ve Kerrigan işaretlenmiş mikroküreleri kullanarak, flep bazında kan akımı değişiminde genellikle 6-12 saat içinde distalde bu akımın normalin %20'sinin bile altına düştüğünü göstermişlerdir.^{80,81} Akım ancak 1-2 hafta içinde normalin %75'ine, 3-4 hafta içinde %100'üne döner. Bu nedenle deri flebinin distalini de yaşatmak için yeterli dolaşımın ilk 6-12 saatte sağlanması gerekir. Flep patofizyolojisine, hem distal nekrozlar hem de geciktirme işleminin flep yaşayabilirliğine katkıları incelenerek açıklık kazandırılmaya çalışılmaktadır.

Bu konudaki en geçerli hipotezler arteriovenöz anastomoz-denervasyon süpersensitivitesi hipotezi ve vasküler kollateral hipotezleridir. Reinisch'e göre akut olarak kaldırılan fleplerde sempatik denervasyona bağlı arteriovenöz anastomozlarda gelişen dilatasyon sonucu distaldeki kapiller yatağa giden yeterli besleyici akım azalmakta ve bu nedenle nekroz görülmektedir.¹³¹ Daha sonra Kerrigan ve Pang'ın yaptığı çalışmalarda bu teze karşı çıkmış ve aslında distalde nekroza neden olanın küçük arteriollerdeki vazokonstriksiyona bağlı yetersiz distal akım ve distalde perfüzyon basıncının düşmesi olduğunu söylemişlerdir.¹⁵⁶ Cutting ve arkadaşları ise postoperatif ikinci günden sonra fleplerde kan akımının arttığını, Reinisch'in hipotezi doğru olsa arteriovenöz anastomozlardan kaçak olacağı için fleplerde kan akımının artmayacağını, bunun da kendi bulgularıyla ve daha önce Guba'nın yaptığı çalışmadaki bulgularla çeliştiğini saptamışlardır. Bundan yola çıkarak kendi sonuçlarının yeni damar kollaterallerinin oluşması veya mevcut olanların dilatasyonu ile açıklanabileceğini söylemişlerdir.³⁴ Kerrigan, bir flebin nekroza gitmesinde en önemli

etkenin arteriyel yetmezlik olduğunu göstermiş ve distalinde nekroz olan akut ve geciktirilmiş deney modelinde “choke” damarlarda kan akımında anlamlı bir değişiklik olmadığını bulmuştur.^{80,81} Young’ın domuzlarda yaptığı fonksiyonel ve morfolojik çalışmada ameliyattan 7 gün sonra damar sayısında ve dermis kalınlığında artış saptandığı belirtilmiştir.¹⁶⁶ Tüm bu çabalara ve çelişkili sonuçlara karşın flep nekrozları da, patofizyolojisini bulmaya ve engellemeye yönelik çalışmalar da devam etmiştir. Taylor’ın 1990’lı yıllarda çeşitli araştırmacılarla yaptığı çalışmalar neticesinde flep kaldırıldığında meydana gelen histolojik değişiklikler şöyle özetlenmiştir:¹¹⁰

1. Flebin içerdiği arterlerin tümünde çap artışı olur.
2. “Choke” damarlar seviyesinde bu artış en çok olup, damar çapları 2-4 katına çıkar.
3. İlk 48-72 saatte “choke” damar dilatasyonu ile beraber damar kas yapısını oluşturan hücrelerde sayı ve boyutça artış olur.
4. Bu dilatasyon 7 günden sonra geri dönüşümsüz bir hal alır.

Deneysel modeldeki hayvanın türüne göre değişmekle birlikte postoperatif yaklaşık 3.-5. günler arasında alıcı yatakla flep arasında neovaskülarizasyon gözlenir.^{114,153,166} Herhangi bir iskemi durumunda yeni damar oluşumu için dışarıdan uyarıcı çeşitli ajanlar verilebileceğinin saptanması bu konuya ilginin giderek artmasına neden olmuştur.¹²⁰

Flebin

distal bölümündeki göreceli iskemik bölgede gerçekleşen metabolik değişiklikler oksijen, glikoz ve ATP düzeylerinde azalma karbondioksit ve laktik asit düzeylerinde artma şeklindedir. Anaerobik metabolizmanın devreye girmesiyle toksik serbest oksijen

radikallerinin üretimi artar ve doku hasarlanmasının devam etmesine neden olan ilave mekanizmalar ortaya çıkar.

E. PEDİKÜL AYIRMA ZAMANI

Rekonstrüktif cerrahın karşı karşıya kaldığı en önemli problemlerden birisi de pediküllü bir flebin en uygun pedikül ayırma zamanının ne zaman olduğudur. Flebin bulunduğu yer, hastanın yaşı, beslenme durumu, ek sağlık problemlerinin de bu zamanlamayı etkileyebilmesi cerrahın ideal pedikül ayırma zamanı konusunda kararsız kalmasına neden olur. Transpozisyonlarını takiben fleplerin yaşayabilirliği, pediküllerinin ayrılması sonrası maksimum sağkalımın sağlanabilmesi ve aksiyel paternli bir flebin iskemik random kısmının yaşayan oranının arttırılabilmesi çoğunlukla alıcı yataktan olan neovaskülarizasyona bağlıdır.^{139,153,166} Klinikte basamaklı flep transferlerinde pedikülün kesilmesinden önce yeterli neovaskülarizasyonun geliştiğinden emin olabilmek için en az 10-14 gün beklenmesi önerilmektedir. Bu uzun dönemde hareketleri kısıtlanan hastalarda kontraktürler, bası yaraları vb. komplikasyonlar gelişebilmekte, iş ve güç kaybının daha uzun süre devam etmesine neden olmaktadır.⁸² German ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada köpeklerde 7 günde, insanlarda 10 günde flep ayrılabilceği belirtilmiştir.⁴⁰ Tsur ve arkadaşları sıçanlar ve domuzlarda yaptıkları deneylerde kaldırdıkları fleplerin pediküllerini farklı zamanlarda ayırmış ve bu ayırma işleminin domuzda 4, sıçanda 7 günde güvenle gerçekleştirilebileceğini göstermişlerdir.^{40,153} Douglas, Buchholz, Gatti ve Hynes gibi araştırmacılar da çalışmalarına katılan hastalarda 9-11 günde ayırdıkları fleplerde başarılı sonuçlar bildirmişlerdir.^{10,33,40,55,56,85,86,88,91,160} Klingenström ve Nylen kendi üzerlerinde tüp flep oluşturup bunları 7 günde ayırmış ve başarılı sonuçlar aldıkları için daha sonra hastalarındaki pediküllü flepleri de 7-14 günde ayırmışlar ve iyi sonuçlar elde etmişlerdir.⁸⁴ Deneysel

çalışmalarda, flebin distal kısımlarında alıcı yatak damarlarıyla flep arasında 3-4 gün içinde damar bağlantıları gösterilmiş olsa da,¹¹⁵ klinik uygulamada cerrahlar flep nekrozu görmemek için halen fleplerini 14 gün civarında ayırmaktadır. Fakat neovaskülarizasyon üzerine etkisi olduğu bilinen anjiyojenik faktörlerin saptanıp flep deneylerinde kullanılmaya başlanması hem flep prefabrikasyonunun popülerleşmesinin sağlanması, hem de pedikül ayırma zamanının kısaltılabilmesi açısından ümit vaat etmektedir.⁸²

F. GECİKTİRME FENOMENİ

Yukarıda anlatılan tüm bu tarihsel ve bilimsel gelişim sürecinde değişmeyen tek ideal, flep yaşayabilirliğinin sağlanması veya canlı flep dokusu oranının artırılması, nekrozların önüne geçebilecek ideal yöntemin bulunması olmuştur. Bu amaçla 16. Yüzyılda Tagliacozzi biceps kasının üstündeki deri ve cilt altı dokuya paralel kesiler yaparak kol fleplerine geciktirme uygulamıştır, fakat bu kavramın farkına varılıp popülerliğe kavuşması 1900'lerin başında olmuştur.^{30,31,79} Blair ilk defa 1921'de "geciktirilmiş transfer" terimini literatüre sokmuş^{30,31,103} bundan sonra geciktirme işleminin biyokimyasal ve patofizyolojik özelliklerini ortaya koymaya yönelik pek çok çalışma yürütülmüş ve çeşitli teoriler öne sürülmüştür.³⁸ Geciktirme işlemi, planlanan flebin transferinden önce, flep kaldırılması planlanan alana giden kan akımının bir bölümünün cerrahi yöntemlerle engellenmesidir.^{79,113} Geciktirmenin etkinliği distalde iskemi olan bölgede belirgindir. Cerrahi olarak yapılan geciktirme işlemi sonrası kan akımındaki artışın başlama zamanının çeşitli hayvanlarda farklı olduğu gösterilmiş, en kısa süre Suzuki ve arkadaşları tarafından 1. günün sonu olarak sıçanlarda tespit edilmiştir.^{114,146}

Erken Teoriler: Braithwaite 1950 ve 1951’de geciktirilmiş fleplerde damar sayısının artmadığını, subdermal pleksustaki damarların genişleyip reaktif hiperemiyle dolaşımı arttırarak flep yaşayabilirliğini arttırdığını, ayrıca oluşan hipoksinin damar yapısını değiştiren histamin salınımını arttırdığını belirtmiştir. Bunun üzerine Stark ve DeHaan iotoforezis yöntemini kullanarak histaminin damarlanmayı arttırdığını, fakat sağkalıma etki etmediğini deneysel olarak göstermiştir.^{30,103,111} Velander 1964’te, geciktirmenin non-spesifik bir inflamatuvar reaksiyonun sonucu olduğunu söylemesine rağmen birkaç yıl sonra 1969’da Myers ve Cherry bu tezi çürütmüştür. Bu araştırmacıların bipediküllü fleplerde santraldeki damarları koruduklarında daha az geciktirme etkisi olduğunu göstermeleri¹¹¹ en önemli olayın hipoksi olduğunu desteklemiş ve ardından McFarlane de geciktirmenin dokuları hipoksiye alıştırdığını, fakat bunun ikincil önemdeki etki olduğunu savunmuştur.^{31,106} Boyd ve arkadaşları da geçici hipoksinin vazodilatasyon için kuvvetli bir uyaran olması nedeniyle varolan arteriollerin açılmasını ve kan akımının artmasını sağladığını düşünmüşler, böylece 1990 yılında erken teorileri destekleyen sonuçlar yayınlamışlardır.¹⁹

Sempatektomi-Vazodilatasyon Hipotezi: Hynes tüp fleplerde yaptığı ter testine dayalı çalışma sonucunda geciktirme mekanizmasının sempatektomi ve buna bağlı oluşan damarlanma olduğunu vurgulamıştır.^{19,79} 1950’de Hynes tarafından ilk kez bahsedilmiş olmasına rağmen ancak 1970’li yıllarda sempatik sinir sisteminin damar tonusu üzerindeki etkisi dikkat çektiği için geciktirmeyi sağlayan denervasyon sonrası oluşan vazodilatasyon olduğu iddiası popülerite kazanmıştır. Finseth ve Cutting bilateral pediküllü sıçan epigastrik flebinin bir pedikülünü önceden bağlayarak geciktirme yapabilmiş, mekanizma olarak da denervasyon ve/veya hipoksiye bağlı kalıcı vazodilatasyon gelişmesini göstermişlerdir.⁴⁷ Jurell’in 1986 yılında yayınladığı çalışmasında geciktirilmiş ve geciktirilmemiş fleplerde

sempatik denervasyonun etkisini araştırmak için norepinefrin, ATP ve c-AMP düzeyleri incelenmiştir. Jurell geciktirme uygulanan fleplerde nörotransmitterlerin kendiliğinden boşaldığını, daha sonra norepinefrinin azaldığını ve buna bağlı olarak vazokonstriksiyonda da azalma olduğunu, ikinci ameliyatta norepinefrin düzeylerinin daha da düşük olduğunu saptamıştır.⁷³ Antiadrenerjik ilaçlarla yaptığı çalışmalar da bunu desteklemiştir.^{74,75}

Vazodilatatör ajanlarla (isoxuprine, guanethidine, hydralazine, phenoxybenzamine gibi) ameliyat öncesi ve sonrası tedavi edilen fleplerde yaşayabilirliğin artması sempatektomiye bağlı vazodilatasyon hipotezini desteklemiştir. Fakat geciktirme fenomeninin sempatektomiden minimum 48 saat sonra başlaması olayda etkin olan daha başka mekanizmaların varlığını düşündürmüştür.^{46,59,117,136,152,162}

Flep İçinde “Shunt” Hipotezi: Reinisch 1974’te geciktirilmiş arteriyel fleplerde radyoaktif krom ile işaretli kan hücreleri ve stronsiyum ile işaretli mikroküreler kullanarak kan akımını gözlemlemiş, sempatik denervasyonun “A-V shunt” ları prekapiller sfinkterlerden daha çok dilate ettiğini, bu nedenle flep içinde kanın besleyici kapiller yataktan geçmeden “A-V shunt”lardan geçerek dolaşıma katıldığı hipotezini öne sürmüştür. Geciktirme işlemi sırasında flep kan akımının flep tam kaldırıldığındaki kadar azalmadığını, “A-V shunt”lardaki vazodilatasyonun da iki haftada belli bir tonusa ulaştığını ve bu işlem sonrası flep tam olarak kaldırıldığında distalde “shunt” olayının olmadığını göstermiştir.^{123,131} Diğer bazı araştırmacılar adrenerjik sinirlerin kesilmesinin ardından sinir uçlarından tüm depolanmış katekolaminlerin salındığını ve bunları inaktive edecek “reuptake” mekanizması da ortadan kalktığı için hipereadrenerjik bir durum oluştuğunu göstermişlerdir ve bunun prekapiller sfinkterleri etkileyerek besleyici kapiller akımı azalttığını gösterip Reinisch’in teorisine karşı çıkmışlardır.^{31,123,125}

Kerrigan da radyoaktif mikroküreler kullanarak fleplerde proksimalden distale gidildiğinde kan akımında azalma olduğunu göstermiştir. Aynı zamanda distalde arteriovenöz anastomozların olmadığını gözlemleyip distaldeki nekrozu arteriovenöz "shunt"a değil yetersiz arteriyel akıma bağlamıştır.⁸⁰ Dorion ve arkadaşları da domuz TRAM flep modelinde mikroküre tekniğini kullanarak "denervasyon süpersensitivitesi" ve "A-V shunt" akımının geciktirmeyi açıklayacak ana mekanizma olamayacağını göstermişlerdir.³⁹

Akut olarak kaldırılan bir flepte hiperadrenerjik bir durum oluştuğunu ve vazokonstriksiyon olduğunu iddia eden araştırmacılardan bazıları da reserpin, 6-OH dopamin, propranolol, guanetidin ve fentolamini preoperatif olarak kullanıp flep yaşayabilirliğini arttırdıklarını iddia etmişlerdir. Fakat, benzer ilaçlar ve aynı mekanizmayı uygulayarak başarılı sonuçlar elde edemeyen araştırmacılar da vardır.^{1,31,35,81}

Neovaskülarizasyon Hipotezi: German, Seitchik ve Kahn geciktirme sonrası tüp pedikülün uzun eksenine boyunca küçük damarlarda longitudinal reoryantasyon ve boyut artışı olduğunu ve subdermal pleksusta arter sayısında artış gözlemlediklerini belirtmişlerdir.⁷⁹ McFarlane ve arkadaşları aynı longitudinal reoryantasyonu rapor etmesine rağmen damar sayısı ve çapında artış saptamamıştır.⁷⁹ Muhtemel mekanizmayı hipoksiye alıştırma, flebin iskemik ortamda yaşamaya hazır hale gelmesi olarak yorumlamışlardır.

Johnson kan damarlarının flebin uzun aksına paralel olacak şekilde yeniden düzenlendiğini, kan akımındaki artışın ise önce vazodilatasyon sonra anjiogenez sayesinde arttığını bildirmiştir. Geciktirme sonrası iyileşme sürecinde inflamasyon ve anjiogenezin önemli bir rolü olduğu görüşünü savunmuştur.⁷² Young'ın normal deri ile kıyaslandığında fleplerin distal kısmında besleyici kan akımında azalma saptaması flebin proksimalindeki

damar anastomozlarındaki dilatasyonu desteklemiş ve sonuçta yazar hipoksinin neovaskülarizasyonun en potent uyarıcısı olduğunu savunmuştur.¹⁶⁶

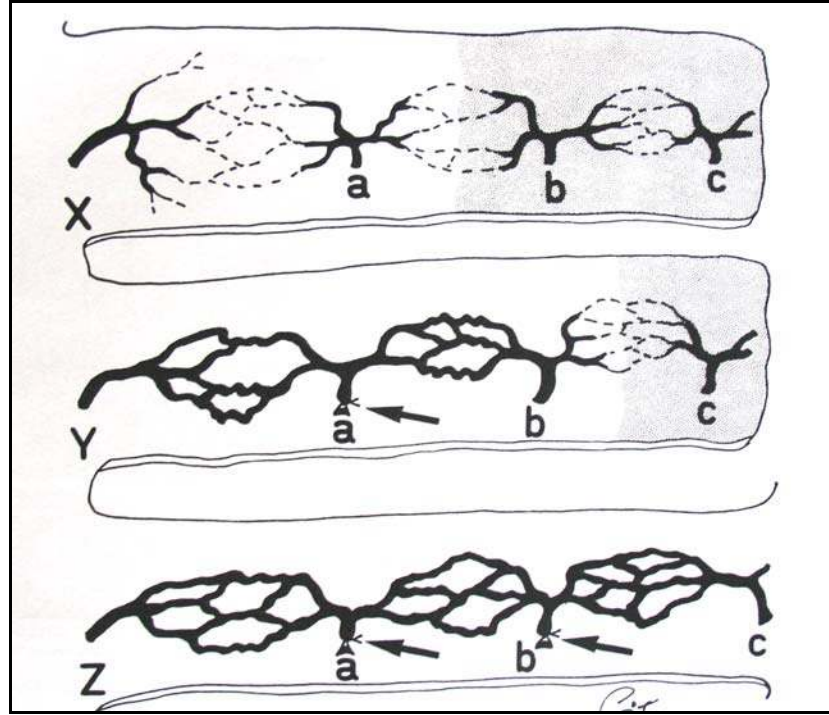
Pang ve arkadaşları geciktirilmiş fleplerde ilk 6 saatte besleyici kan akımının normalde aynı bölgeye olan total kan akımının %10'undan daha düşük olduğunu daha sonra kapiller kan akımında 2. günün sonuna kadar hızlı bir artış olduğunu gözlemlemiş, fakat bu dramatik artışın sadece neovaskülarizasyon ile açıklanamayacağını, muhtemelen nörohumöral maddelerin küçük arterlerde oluşturduğu vazokonstriksiyon neticesi gerçekleştiğini düşünmüşlerdir. Bu sonuçlarla geciktirmenin erken safhasında vazokonstriksiyona neden olan nörohumöral maddelerin azalmasının, ilerleyen safhalarında ise lokal olarak salınan vazodilatör maddelerin artmasının rol oynadığını düşünmüşlerdir.^{123,124,145} Bu araştırmacılar önce Serafin ve daha sonra Garcia hem damar çapında hem de sayısında artış saptadıklarını belirten yayınlar yapmışlardır. Yine Garcia ve Ortega'nın dahil olduğu ekip tavşanlarda geciktirmeden sonraki 3-7 gün içinde anjiogeneze artış olduğunu saptamışlardır.^{54,93,139} Lopez anjiogenezi immünohistokimyasal olarak incelemiş ve geciktirilen fleplerde postoperatif 48. saatten başlayıp 7. güne kadar süren kapiller artışı göstermiştir.⁹⁴ Cerrahi yerine anjiogenik ajanları kullanarak flep yaşayabilirliğini arttırmaya çalışan Brown, Höckel, Burke, Zhang ve Lineaweaver olumlu sonuçlar almışlar ve geciktirme etkisinin farmakolojik olarak sağlanabileceğine yönelik umutları arttırmışlardır.^{99,167,168,169,171} Angiogenez sayesinde geciktirmeyi açıklamaya çalışan araştırmacılar Hayward da bazik fibroblast büyüme faktörünü kullanmış, fakat flep yaşayabilirliği ve dolaşım konusunda bir fark bulamamıştır.⁶⁷

Birleştirici Teori: Yukarıda önerilen mekanizmalardan birden fazlasının geciktirmede rol oynadığını savunan araştırmacılar da vardır.^{31,34,35,46,79,94,145} Cutting ve arkadaşları

geciktirilmiş arteriyel fleplerde sempatektomi, doku iskemisi ve enflamasyon sonucunda prekapiller arteriollerde damar düz kasında gevşeme olduğunu, denerve olan arteriovenöz anastomozların yavaş kapanması sonucunda periferik damar direncinin arttığını ve flep distalindeki kan akımında azalma olduğunu fakat geciktirmenin ikinci gününden sonra deri damarlanmasının düzenlendiğini savunmuşlardır. Böylece, geciktirmenin mekanizmasında sempatektomi, yeni kollateral damar oluşumu ve var olan damarların dilatasyonunun rol oynadığını düşünmüşlerdir.³⁵

Hoopes'un özetlediği geciktirme mekanizmaları⁶⁸ (sempatektomi, damarların yeniden düzenlenmesi, reaktif hiperemi, hipoksiye alışma, nonspesifik inflamatuvar reaksiyon) “choke” damarların tariflenmesinden sonra yeniden gözden geçirilmiş ve geciktirme fenomeninin mekanizması en kabul edilebilir şekilde şöyle açıklanmıştır:

1. Sempatektomi sonrası damarlanmada artış
2. Damarların longitudinal eksene paralel dizilimli hale gelmesi
3. Damarsal büyüme, genişleme
4. Hipoksiye metabolik adaptasyon
5. Anjiozomlar arasındaki “choke” damar dilatasyonu sonucu komşu anjiozomlarla bağlantı artışı (**Şekil 4**).



Şekil 4: Cerrahi geciktirme yapılmış ve yapılmamış fleplerde nekroz çizgisi ve “choke” damarlardaki değişiklikler (Oklar geciktirme için bağlanmış olan damarları, a,b,c ise bir anjiozomu besleyen kaynak damarlarını göstermekte) (Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG: An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical Applications. Plast Reconstr Surg 89(3): 408-418, 1992).

Her ne kadar en etkin geciktirme yönteminin cerrahi yolla yapılan geciktirme olduğu düşünülse de, yukarıdaki mekanizmaların bir veya birkaçını farmakolojik ajanlarla sağlayıp ek cerrahilerin risk ve maliyetlerinden kaçınmak için farmakolojik veya lazerle geciktirme gibi bir yol bulmak cerrahlara çekici gelmektedir.^{2,3,28,43,99,111}

G. FİBRİN YAPIŞTIRICI (FY)

Cerrahinin temel prensiplerinden olan yaraların kapatılması, uygun yara iyileşmesinin sağlanması adına suture materyalleri vazgeçilmez bir araç olmuştur. Gelişen inflamatuvar reaksiyonlar, granüloma-fistül oluşumu ve yabancı cisim reaksiyonu gibi komplikasyonların görülmesi bu tür komplikasyonlara neden olmayacak, ucuz ve kullanımı kolay maddelerin arayışını beraberinde getirmiştir. Böylece siyanoakrilatlar travmatik doku yapıştırıcı olarak kullanılmaya başlanmıştır.⁵⁸ Fakat zaman içinde bu materyallerin de granülasyon dokusu oluşumu, yabancı cisim reaksiyonu vb. komplikasyonları ortaya çıkmış ve daha ideal doku yapıştırıcısı bulmaya yönelik çalışmalar devam etmiştir. İlk defa Bergel'in fibrinin hemostatik etkisini göstermesinden sonra, yara iyileşmesi ve kan pıhtılaşmasında fibrinin önemi anlaşılmış ve dikkatler fibrin öncü maddesi fibrinojene yönelmiştir.^{7,20,104}

Fibrinojen, α , β ve γ peptid zincirlerinden oluşmuş bir dimer olup yara iyileşmesinin ilk basamaklarında Faktör XIII ve trombin ile olduğu kadar Faktör XII ile de etkileşerek hücrelerin içine göç ettiği bir kalıp kurar. Kalsiyum ve trombin ilavesinden sonra içerdiği fibrinojen miktarına bağlı olarak 5-30 sn içinde pıhtılaşma yani fibrin yapıştırıcı oluşumu gerçekleşir.^{7,33,58} İki sistemden oluşan fibrin yapıştırıcının ilk kısmında fibrinojen, soğuk çözünmeyen globulin, plazma proteinleri ve faktör XIII bulunur. Diğer kısmında ise trombin ve kalsiyum klorid vardır. İki sistem karıştığında trombin sayesinde fibrinojen fibrine dönüşüp katılaşır ve pıhtılaşma olayı başlar.⁸ Ayrıca trombin iyonize kalsiyum varlığında Faktör XIII ile etkileşerek, soğuk çözünmeyen globulin ve fibrinin çapraz bağlar kurmasına neden olur.⁹⁸ Bu bağlar sayesinde pıhtının direnç gücü artar; fakat zaman içinde kademeli olarak yıkılır ve 2-3 hafta içinde ortamdan kaybolur.^{33,58,90}

Fibrinojeni trombinin aktif hale getirdiğinin anlaşılmasından sonra 1940'larda Tidrick gibi araştırmacılar tarafından deri grefti sabitlemesinde ikisi kombine kullanılmış, fakat yetersiz fibrinojen miktarı nedeniyle başarı elde edilememiş ve yaklaşık 30 yıl boyunca fazla kullanılmamıştır.^{24,33} Fibrinojen miktarı artırılan fibrin yapıştırıcı ile 1970'lerin başında Millesi ve arkadaşlarının deneysel olarak sinir anastomozunda başarı elde etmeleri nedeniyle tekrar popüler olmuş ve tüm vücutta kullanım alanı bulmuştur.

Kulber yaptığı deneysel çalışmada, sıçan latissimus dorsi seroma modelinde fibrin yapıştırıcı kullanıldığında seroma oluşumunda azalma olduğunu göstermiştir.⁹⁰

Sinir anastomozlarında, yumuşak doku defektlerinde hemostaz ve keratinosit kültürleriyle birlikte yara iyileşmesi amaçlı, deri greftlerinin tespitinde,^{24,33,58,157} kansellöz kemik greftleriyle birlikte, maksillofasiyal cerrahide, kanama eğilimi olan hastalarda diş çekimi sonrası alveoler kavitede, dura yapıştırmada, spontan pnömotoraks olgularında hava vakum drenaj ile birlikte hava kaçağını önlemek için, akciğer rezeksiyonu sonrası hava- sıvı kaçağını önlemek için, vasküler anastomozlarda, peptik ülser kanamalarında kanamayı durdurmak için, yüz-boyun germe, meme küçültme ve büyütme, abdominoplasti gibi estetik ameliyatlarda kanamayı, sonrasındaki şişlik ve morluk oluşumunu azaltmak; dren kullanım süresini kısaltmak veya hiç kullanılmamasını sağlamak amacıyla kullanılmaktadır.^{8,17,18,20,24,33,45,57,58,98,119,150}

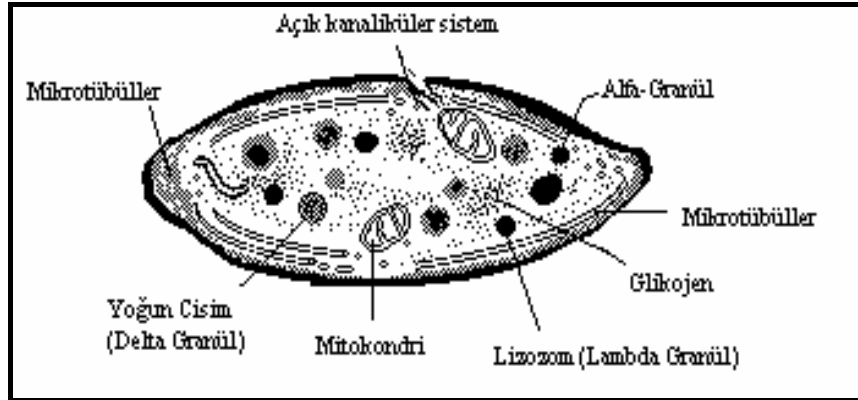
Ticari olarak hazırlanmış olan fibrin yapıştırıcıların hastalık taşıma riski nedeniyle kullanımı kısıtlanmıştır.^{8,33} Otolog olarak kullanılması bu riski ortadan kaldırır, fakat ameliyattan önce hastanın kan vermesi gerekliliği ve yüksek maliyeti kullanımını sınırlayabilmektedir. Partsafas sıçan epigastrik flep modelinde fibrin yapıştırıcının flep yaşayabilirliğine olumsuz etkisi olmadığını bulmuş ve serbest doku aktarımı yapılan

bölgelerde bile güvenle kullanılabileceğini söylemiştir, fakat çok yoğun bir fibrin pıhtısı oluşturduğu için, yara iyileşmesini sağlayacak maddelerin yaraya temasını engelleyerek bu iyileşmeyi olumsuz yönde etkileyebileceğini savunanlar da olmuştur.^{14,33} Bu nedenle, hemostaz sağlayıcı ve yara iyileştirici özellikleri olduğu bilinen fibrinojen ve büyüme faktörlerini içeren trombosit zengin plazma kullanıma girmiştir.

H. TROMBOSİT ZENGİN PLAZMA (TZP)

Trombositlerin Yapısı ve İçerikleri

Trombositler kemik iliğindeki megakaryositler tarafından üretilen 2-4 µm çapında, mitokondri ve mRNA içermesine rağmen çekirdek içermeyen sitoplazma parçacıklarıdır. Dinlenme halinde tipik olarak disk şeklinde olmalarına rağmen aktive olduklarında 5 µm'ye kadar ulaşabilen psödopodlar içeren globüler bir şekil alırlar. Vücutta herhangi bir zamanda dalakta lokalize olarak bulunur ve periferik dolaşıma geçtikten sonra ortalama 8-10 gün yaşarlar. Periferik yaymada kümeler halinde gözlenen trombositler tek tek incelendiğinde açık mavi boyanan periferik “hyalomer”, mor granüller ve mitokondrilerden oluşan santral “granülomer” kısımlarından oluştuğu görülür. Hem hücre zarlarının sitoplazma içine parmak şeklinde girmesi sonucu oluşan ve yüzeye açılan “açık kanaliküler sistem” olarak adlandırılan bir kanalikül sistemine, hem de hyalomer bölgesinde trombosit aktivasyonu için gerekli olan kalsiyum iyonlarını depolayan “yoğun tübüler sistem” adı verilen ikinci bir kanalikül sistemine sahiptirler. Yüzeylerinde bulunan reseptörleri, trombin, kollajen vb. moleküllerin uyarmasıyla aktif hale geçen trombositler, sitoplazmalarındaki aktif molekülleri içeren granülleri “açık kanaliküler sistem” yoluyla dışarı atarlar (**Şekil 5**).



Şekil 5: Trombosit yapısı

Yoğunluk ve içeriklerine göre üç değişik granül tariflenmiştir: ¹³²

1. Delta Granüller (Yoğun Cisimler): 250-300 nm çapında kalsiyum, pirofosfat, ADP, ATP gibi molekülleri içerip, serotonin deposu olarak görev yapan granüllerdir.

2. Lambda Granüller (Lizozomlar): 175-250 nm çapında olup içinde asit hidrolazlar gibi lizozomal enzimler olan granüllerdir. Bakterisidal etkisi olan glikozidaz, proteaz gibi proteinleri de içerirler.

3. Alfa Granüller: 200-400 nm çapında tek kat membranlı büyük organeller olup sayısal olarak trombositlerin majör granülleridir. Bu granüllerin koyu renkli boyanan alanlarında proteoglikanlar, açık renkli bölümlerinde vWF, albumin gibi proteinler ve tübüler yapılar vardır. Alfa granüllerin hemostaz, inflamasyon, kemik ve yara iyileşmesinde görevli pek çok protein ve büyüme faktörünü içermesi, trombositlerin yoğunlaştırılarak klinikte yara, kemik iyileşmesi gibi alanlarda kullanımının gündeme gelmesine neden olmuştur (**Tablo 1**).

Tablo 1: Trombosit granüllerinin içerikleri

Delta Granül (Yoğun Cisim)	Alfa Granül	Lambda Granül (Lizozomlar)
Nükleotidler • ATP,ADP • GTP,GDP Aminler • Serotonin • Histamin Çift değerlikli Katyonlar • Kalsiyum • Magnezyum	Glikoproteinler • Fibronektin, vWF, Trombospondin,vb. Hemostaz Faktörleri • Fibrinojen, Faktör V, VII, XI, XIII, Protein S, Plazminojen,vb. Hücresel Mitojenler • PDGF, TGF-β, EGF, VEGF, FGF-II, vb. Proteoglikanlar • PF4, HRGP, PBP, vb. Proteaz İnhibitörleri Albumin ve immünglobulinler	Asit Proteazlar • Katepsin D, E • Karboksipeptidazlar • Kollajenaz • Asit Fosfataz • Arisülfataz Glikohidrolazlar • Heparinaz • Diğerleri

Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan büyüme faktörlerinin yanı sıra, salınan ADP ve Tromboksan A₂ gibi moleküller diğer trombositleri aktive ederek, vWF (von Willebrand Faktörü) trombositlerin birbirine yapışmasını sağlayarak pıhtılaşma mekanizmasında görev alırlar.^{130,132}

Büyüme Faktörleri

Anjiyenez terimi ilk kez plasentadaki yeni damar oluşumunu tarif etmek için 1935'te kullanıma girmiş ve daha sonra tüm yeni damar oluşumları için kullanılır olmuştur. Dokuların normal büyüme ve gelişmesi için damar proliferasyonu gerekli bir işlem olmasına rağmen

erişkinlerde anjiogenez nadir olarak gözlenir. Üreme sisteminde folikül ve korpus luteumda, hamilelik sonrası plasentada, yara ve kemik iyileşmesinde normal olarak gerçekleşirken; tümörlerde, diyabetik retinopati gibi durumlarda kontrolsüz ve patolojiktir. Bu nedenle anjiogenezi uyaran ve durduran bir takım faktörlerin araştırılıp bulunması vücudun normal ve patolojik işleyiş mekanizmalarının kısmen de olsa aydınlanmasını sağlamıştır.^{25,29,37,48,49,50,83} Anjiogenez çeşitli anjiojenik faktörler tarafından doğrudan ya da dolaylı olarak başlatılıp yönlendirildiği bilinen kompleks bir mekanizmadır.^{49,50,66,71,120,133,134} Son yıllarda büyüme faktörlerinin yara iyileşmesini ve anjiogenezi olumlu yönde etkilediğinin saptanıp etki mekanizmalarının açıklığa kavuşturulması, araştırmacıların kemik, yara, tendon, sinir iyileşmesine yönelik deneysel ve klinik uygulamalarında bu faktörleri daha büyük ilgi ile kullanmalarına neden olmuştur.^{29,37,71,120,133,161} Büyüme faktörleri polipeptid sitokinlerdir ve tüm vücutta kendilerine özgü reseptörler üzerinden etkilerini göstermektedirler.¹⁰⁸

Dolaşımda bulunan trombositlerin α -granüllerinde VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor), PDGF (Platelet Derived Growth Factor), TGF β 1 ve β 2 (Transforming Growth Factor- β 1 ve β 2), bFGF (bazic Fibroblast Growth Factor) gibi pek çok büyüme faktörü depolanmış durumdadır. Çeşitli uyaranlara karşı trombosit aktivasyonu olduğunda bu maddeler granüllerden salınırlar.^{10,11,32,33,51,56,70,85,86,88,89,91,98,160,165}

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): Fibroblast ve düz kas hücreleri üzerinde mitojendir ve yara iyileşmesinin erken dönemlerinde ilk saptanan moleküllerden birisidir. AA, AB ve BB şeklinde üç izoformu olan PDGF molekülü hücre membranındaki reseptörlere bağlanınca sitoplazmadaki yüksek enerjili fosfat bağı içeren bir sinyal proteini aktive olur ve bu sinyal iyileşmede görevli hücrelerin çoğalmasına, anjiogeneze, kollajen, fibronektin, hyaluronik asit üretilmesine, diğer büyüme faktörleri ve hücrelerin

fonksiyonlarının artmasına aracılık eder. Böylece fibroblastik ve osteoblastik faaliyetler artar, hücreler farklılaşır, büyüme faktörlerinin makrofaj gibi hücreler üzerindeki etkileri hızlanmış olur.^{91,95,141,163} PDGF insan mezenkimal hücreleri için de primer mitojen olan bir büyüme faktörüdür. Bu etki plazmada diğer büyüme faktörlerinin bulunmasına bağlı olup interferon- γ sayesinde daha da artar.^{10,17,62,120,138} PDGF'nin nötrofil, monosit, makrofaj ve fibroblastlar için kemotaktik olmasının diğer büyüme faktörlerinin varlığından bağımsız olmasının yanı sıra, yara iyileşmesinin ileri safhalarında kollajenaz aktivasyonu yaparak 'remodelling'e katkıda bulunması gibi bir özelliği de vardır.^{20,61,62,69,85,86,128,142} PDGF ve TGF- β yara iyileşmesinde rol oynayan faktörler olup genellikle sinerjistik etki gösterir. Kollajen miktarını arttıran bu iki proteinin de kemik, periodontium, tendon, sinir ve deri iyileşmesini stimüle ettiği, yara kuvvetini arttırdığı gösterilmiştir.^{7,53,61,89,121,141,172}

Deneysel hayvan çalışmalarında tendon, ligament ve kırıkta yaralanmalarında tamiri uyarıcı etkisi gösterilmiştir.^{11,87,127,128,138,142,144,159,161,164} Kalvaryal kemik defektlerine metilselüloz içinde tek doz uygulanmasının kemik ilerlemesini, mineralize dokuyu, kemik iliği miktarını, yani kemikleşmeyi arttırdığı saptanmıştır.¹⁵⁸ Brown sıçan epigastrik ada fleplerinin pediküllerinde 3-4 mm'lik defektler yaratıp bu alana PDGF vermiş ve aradaki bölgede 3 hafta içinde yeni bir damar oluştuğunu görmüştür. Flep periferinde yeni damar oluşumlarının arttığını da gözlemlemesinin üzerine PDGF'nin flep alanına verilmesinin erken pedikül ayırmaya izin verdiğini belirtmiştir.²¹ Kas fleplerine uygulandığında da flep sağkalımını arttırdığı anlaşılmıştır.²⁶ Hayvanlardaki deneysel yara iyileşmesi çalışmalarında granülasyon dokusunun ve ekstraselüler matriksin arttığı, iyileşmenin hızlandığı gösterilmiştir.¹²⁸ Yine diyabetik hale getirilen sıçanlarda yapılmış olan bir çalışmada, bozulmuş olan yara iyileşmesini PDGF uygulamasının normalde olması gereken hale

getirdiği, inflamatuvar cevabı arttırmadığı, erken safhada DNA sentezi ve kollajen miktarını arttırmasına rağmen 20. gün civarında bu değişimlerin normale döndüğü saptanmıştır.⁶² Klinikte diyabet ya da iskemi kaynaklı kronik deri ülserlerinde yara iyileşmesini arttırmak için, maksillofasiyal cerrahide kemik grefti yerleştirilen bölgede, oral ve nazal fistüllerin cerrahi onarımında, kemik-integre implantlara destek olarak kullanılmıştır.^{69,101,163} Rekombinant DNA teknolojisiyle üretilmiş olan PDGF (becaplermin 0,01 %- Regranex OMP, Raritan, NJ) ile kronik yaralarda yapılmış olan iyileşme çalışmaları da ümit vaat eden sonuçlar sunmaktadır.^{20,69,143}

“Transforming” büyüme faktörü (TGF- β): TGF- β fibroblast çoğalmasını uyaran plasenta kaynaklı bir madde olarak 1983 yılında keşfedilmiştir. Fakat daha sonra tüm vücutta yaygın olarak bulunduğu, hücre siklusu regülasyonu, embriyogenez, organ gelişimi gibi pek çok biyolojik aktivitede görev aldığı fark edilip çeşitli araştırmalarda odak noktası olmuştur. Üç farklı izoformundan TGF- β 1 ve β 2 trombositlerde bulunduğu ispatlanmış olan, bağ dokusu iyileşmesi ve kemik rejenerasyonunda görev alan, TGF’ün en sık görülen alt gruplarıdır. Hücre büyümesi, extraselüler matriks üretimi, anjiogenezin uyarılması, yara iyileşmesi ve farklılaşması gibi çeşitli biyolojik olaylarda rol alırlar.^{7,89,120} Fibroblastları prokollajen üretimi için aktive ederek yarada kollajen depolanmasına neden olurlar.⁸⁹ TGF- β lar parakrin olarak etkilerini fibroblast, kemik iliği kök hücresi ve preosteoblast gibi hücreler üzerinde gösterebilirler ve bu hedef hücreler de yine TGF- β salgılayabilirler. Böylece TGF- β yalnızca yumuşak doku ve kemik rejenerasyonunu başlatmakla kalmayıp remodelling aşamaları ve kemik grefti olgunlaşmasında da etkili olur.^{96,101,116} Sıçanlarda yapılan çalışmada insizyonların altına tek doz TGF- β uygulanmasının ardından yara gerim kuvvetini %51 arttırdığı gösterilmiştir.²² Rekombinant TGF- β uygulaması da benzer sonuçlar vermiştir.¹⁰⁸

Çeşitli çalışmalarda epidermal rejenerasyonu, angiogenezi, tendon ve ligament iyileşmesini hızlandırdığı da gösterilmiştir.^{61,69,83,87} TGF- β ile transfekte edilmiş adenovirüslerin sıçan epigastrik fleplerine enjeksiyonu sonucu flep yaşayabilirliğinin, damar yoğunluğu ve çaplarının arttığı saptanmış ve gen terapisinin iskemide kullanılabileceğinin göstergesi olmuştur.⁷¹

Aşırı ve düzensiz kollajen depolanmasına neden olarak fibrozis ve skar formasyonunun oluşumunda önemli rol oynayan bir sitokin olması, uygulandığı bölgelerde hipertrofik skar yaratabileceği yönünde endişelerin gelişmesine neden olmuştur; fakat TGF- β ailesinin üyelerinden olan BMP (Bone Morphogenetic Protein) ler ortopedik cerrahide önçalışma niteliğinde kullanıma girmiş durumdadır.⁶⁹

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF): Fibroblast büyüme faktörleri mitojenik polipeptid ailesidirler. İçlerinde en çok incelenmiş olan altgrup bFGF; fibroblastlar, endotel hücreleri, osteoblastlar, kondrositler ve keratinositler üzerinde mitozu arttırıcı etki gösterir, angienez ve endotelyal hücre göçünde rol oynar, TGF- β 'nın dağılımını arttırıcı etki yapar.^{83,120} VEGF ve TNF- α ile birlikte olduğunda maksimum anjiogenik etkisini gösterir. Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olur. Angiogenезin başlaması için gerekli olan fibroblastlardan kollajenaz üretimi ve kapiller endotel hücrelerinin proliferasyonunu sağlar.^{33,133} Granülasyon dokusu oluşumunu başlatmaya da yardımcı olur.⁶² Bazik fibroblast büyüme faktörü ve sucrose octasulfate (sucralfate)' ın ayrı ayrı gastrik ülserler üzerine olumlu etkisi olduğu bilinmektedir.¹²⁹ Rashid ve arkadaşları bu iki maddeyi birlikte kullanarak sıçan dorsal fleplerinde yaşayabilirliği arttırdığını, bunun da angienez sayesinde olduğunu saptamışlardır.^{82,129} Khouri fleplerin altına bFGF, Uhl ise rekombinant bFGF uyguladığında neovaskülarizasyonun ve flep sağkalımının arttığını rapor

etmiştir.^{66,168} Fakat Hayward bFGF verdikten sonra opere ettiği fleplerin sağkalımında anlamlı bir iyileşme sağlayamamıştır.⁶⁷ Yara iyileşmesi üzerindeki etkilerini anlayabilmek için McGee ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada rekombinant bFGF nin kollajen miktar, organizasyon ve maturasyonunu arttırdığını, buna sebep olan faktörün kollajen ve fibroblastların yara yerinde daha erken birikmesi ve kollajen lifleri arasında daha çok çapraz bağ oluşması olabileceğini düşünmüşlerdir.¹⁰⁷ Diyabetik, iskemik ve protein eksikliği olan yaraların iyileşmesini arttırdığı ve tendon iyileşme modellerinde de başarısı gösterilmiştir.^{50,69,120,144} Kardiak enfarktüs sonrası kollateral oluşumunu arttırmak için bFGF ile çalışmalar devam etmektedir.

İnsülin benzeri büyüme faktörü I (IGF-I): İnsan proinsülinine benzerliği nedeniyle bu ismi alan IGF-I, fibroblast, kondrosit, keratinosit, osteoblast, mezangial eritroid progenitör hücreler gibi pek çok hücre tipinin çoğalmasını arttırarak büyümeyi uyarır. PDGF ile birlikte olduğunda daha iyi bir etki gösterir. Dolaşımdaki IGF-1'in protein sentezini, periferel glukoz alımını, glikojen sentezini, sinir sağkalımını, miyelin sentezini, kemik oluşumunu arttıran anabolik etkileri arttırdığı, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azalttığı bilinmektedir. Aşil tendonunda travma oluşturarak yapılan çalışmada düzeyinin arttığı görülüp tendon iyileşmesinde muhtemelen mitozu arttırarak etki gösterdiği düşünülmüştür. Egzojen olarak verilen IGF-1'in DNA, kollajen ve proteoglikanı arttırdığı gösterilmiştir.^{10,69,70} IGF'ün proteoglikan sentez ve yıkımını dengeleyerek kıkırdak homeostazında önemli rol oynadığı öne sürülmüş; ve atlarda yapılan kıkırdak defekti modelinde fibrin pıhtıya IGF ilave edilerek bu defekte uygulandığında onarılan dokunun kalite ve miktarını arttırdığı gözlenmiştir.^{29,37,138}

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF): VEGF'ün, tümör hücrelerinden salgılanan, damar geçirgenliğini arttırarak asit oluşumuna katkıda bulunan bir madde olduğu düşünülmüş ve bu nedenle 1983'te "vascular permeability factor" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonra yapılan çalışmalar doğrultusunda VEGF olarak ismi değiştirilmiş, en kuvvetli fizyolojik ve patolojik anjiogenezis uyarıcısıdır.^{25,33,66,83,120,127,147} Beş adet izoformu bulunan VEGF kendi salınımından sonra diğer proteoglikan-bağlı salınımı olan büyüme faktörlerinin (bFGF) de salınımını uyarır ve bFGF ile sinerjistik anjiogenik etkisi gösterilmiştir.^{37,133} Anjiogenezin ilk basamaklarında vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollajenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra yine anjiogenez için gerekli olan α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiogenez başlatır. Diğer büyüme faktörleri ile kıyaslandığında mitojenik etkisinin endotelyal hücrelerle sınırlı olması teorik olarak VEGF'in vasküler yetmezliklerde terapötik anjiogenez sağlamak için avantajlı olduğunu düşündürmektedir.^{66,133,147} Doğrudan mitotik etkisinin yanında, VEGF bir taraftan kısmen nitrik oksit sentezini uyararak vazodilatasyona neden olurken, diğer taraftan hücre göçünü ve apoptozu inhibe eder.¹⁷¹ Yara iyileşmesinde önemli rol oynayan fibroblast, inflamatuvar ve endotelyal hücrelerin proliferasyon ve göçünün uyarılmasında görevlidir ve vasküler geçirgenliği arttırır.^{17,29,37,51,70,83,167,168,169}

Tümörlerde kompresyon ve iskemiye bağlı gelişen lokal hipoksiye yanıt olarak VEGF düzeylerinde artış olduğu Shweiki tarafından gösterilmiş ve Stavri kalpte iskemiye takiben aterosklerotik plaklarda yeni damar oluşumlarının uyarılmasında hipoksiye bağlı VEGF artışının rol oynayabileceği tezini savunmuştur. Deneysel modellerde ekstremitte iskemisinde egzojen verilen VEGF'in anjiogenez başlatarak vasküler kaynağı, bazı çalışmalarda da vasküler yaralanmanın ardından uygulandığında yeniden endotel oluşumunu arttırdığı

gösterilmiştir.^{69,133,147,168} Corral ve arkadaşları tarafından topikal olarak yaralara uygulandığında olumlu sonuçlar bildirilmiştir.¹⁷⁰ Zhang ve arkadaşlarıysa sıçan TRAM flep modelinde subkutan VEGF uygulamasında flep yaşayabilirliğinde ve anjiogeneziste anlamlı artış saptamışlar; cerrahi geciktirme yapılan sıçan TRAM fleplerinde sitokin düzeylerine baktıklarında TGF- β ve PDGF ekspresyonu değişmezken bFGF ve VEGF ekspresyonlarının anlamlı miktarda arttığını belirleyerek önceki çalışmalarını desteklemiş ve farmakolojik olarak geciktirme etkisi yaratmak için kullanılabileceğini belirtmişlerdir. Aynı araştırmacılar başka bir çalışmada da dışarıdan uygulanan VEGF'in iskemik yaralarda anjiyogenezi uyardığı ve tensil gücü arttırdığını göstermişlerdir.^{93,167,168,169,170,171} Kryger ve arkadaşları hem kas fleplerinde hem de muskulokütan fleplerde VEGF uygulamasının hem subdermal/subfasyal hem de intravasküler olduğunda flep yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkileri olduğunu yayınlamışlardır.⁶⁶ Machens sıçan epigastrik fleplerinin altına VEGF uygulayıp, flep yaşayabilirliğinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan bir artış saptayarak Zhang, Banbury, Kryger ve Padubidri gibi araştırmacıların sonuçlarıyla kısmen çelişmiştir.^{13,97,169,171} Petersen ve arkadaşları da 2002'de tendon anjiogenezinin ana belirleyicisinin VEGF olduğunu bulmuşlardır.

Epidermal büyüme faktörü (EGF): Epidermal büyüme faktörü, yara iyileşmesinin erken safhalarında fibronectin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyarır. Kollajen üretimini arttırmadan fibroblastların çoğalmasını sağladığı düşünülmüş olmasına rağmen Brown ve arkadaşları sıçanlarda insizyon bölgelerine biyosentetik EGF uygulamalarının ardından yaptıkları elektron mikroskopik incelemede artmış kollajen oluşumu göstermişler ve 7-14 gün sonra yara gerim kuvvetinin % 200 arttığını bildirmişlerdir.^{22,97} İn vivo olarak anjiogenezi uyardığı bilinen EGF ile⁸³ yapılan klinik

çalışmalarda gümüş sülfadiazin içine koyularak kronik yaralara uygulandığında epitelizasyonu arttırdığı saptanmıştır.^{23,33}

Büyüme faktörlerine ilave olarak α -granüllerinden trombin, tromboksan A₂ ve ADP salınımı olur. Bu maddeler oluşan pıhtıya daha çok trombositin gelmesine ve hemostatik cevabın artmasına neden olurlar.⁶¹

Trombosit Zengin Plazma (TZP = trombosit jel = büyüme faktörlerinden zengin plazma) Trombositlerin çeşitli yöntemlerle, antikoagülan ilave edilmiş venöz kandan santrifüj edilerek ayrıştırılıp, fibrinojen de içeren az miktar plazma içerisinde süspansiyon haline getirilmesiyle TZP elde edilir. Smart PReP® (Harvest Technologies, Norwell MA), Plasma Seal® (Plasma Seal, San Francisco, CA), Platelet Concentrator® (Implant Innovations, Inc. 3i, West Palm Beach, FL) santrifüj teknolojisini kullanarak TZP hazırlayabilen ileri teknolojiye sahip üç değişik alettir. İleri teknoloji aletler kullanılmasa da mantık olarak minimum 45-60 cc kan, antikoagülan solüsyon içine alındıktan sonra seri santrifüj işlemlerinden geçirilip, kırmızı kan hücreleri, fibrin yapıştırıcı (trombosit fakir plazma) ve trombosit konsantresi (TZP) olarak ayrıştırılabilmektedir. Trombosit sayısı kandaki normal değerinin 3-8 katına kadar konsantre edilebilir.^{7,12,27,101,102,165} Trombin ve kalsiyum ilave edilerek TZP aktif hale getirilir, pıhtılaşarak jel halini alan bu maddedeki trombositlerin α -granüllerindeki büyüme hormonları ortama salınır.^{12,51,91,98,165} Trombosit zengin plazma ile fibrin yapıştırıcının farkı TZP’de trombosit konsantrasyonunun fazla, fibrinojen konsantrasyonunun az olmasıdır.⁵⁸ Daha az fibrinojen içerdıği için çok katı bir fibrin pıhtı oluşmadığı, bu nedenle yara iyileşmesini engellemeyip, bilakis içindeki büyüme faktörleri sayesinde bu olayı hızlandırdığı düşünölmüştür.^{7,8,12,58,98}

Yeterli deneysel çalışmaları yapılmadan önce kullanıma giren TZP'nin genelde kontrol gruplarının olmaması deneysel çalışmalara olan ihtiyacı beraberinde getirmiştir. Yapılmış az sayıdaki deneysel çalışmalardan birisi olan Partsafas'ın çalışmasında FY veya TZP'nin serbest flep modelinde olumlu ya da olumsuz etkisi saptanmamıştır.¹²⁶

Yara bölgelerine TZP uygulayarak yapılan çalışmalarda amaç, yara iyileşmesinin başlatıcıları olan büyüme faktörlerini konsantre şekilde yara bölgesine vererek iyileşme sürecini hızlandırmaktır. Çünkü klinik olarak ciddi birer problem olan kronik yaralarda, bu faktörlerin miktarlarının azaldığı gösterilmiştir. Bu durum, üretimde veya salınımında azalma, yıkımda artma ya da hepsine birden bağlı olabilir. Venöz ülserler, diyabetik yaralar vb. kronik durumlarda kullandıklarında TZP'nin faydalı olduğunu rapor etmiş olan pek çok araştırmacı vardır.^{32,48,100,105,155} Yara iyileşmesini arttıran proteinlerin yanında bakterisidal proteinleri de içermesi, enfeksiyonların kontrol altına alınmasına ve hastanede yatış sürelerinin kısılmasına, ağrı ve şişlikte azalmaya neden olmuştur.^{154,155} Krupski ve arkadaşları ise plasebo ve TZP ile yaptıkları kontrollü çalışmada yukarıdaki araştırmacılarla çelişen sonuçlar elde etmişlerdir.⁸⁸

Marx tek başına kemik grefti uygulaması ile kemik grefti + TZP uygulamasını karşılaştırdığında ikili uygulamada kemik dansitesinde, kemik biçimlenmesinin hız ve derecesinde daha çok artış saptamış ve bunun PDGF ve TGF- β sayesinde olduğunu belirtmiştir.^{58,101,102,160} Anitua da diş çekimi sonrası oluşan boşluğa TZP uygulamış ve hem epitelizasyon hem de kemik dansitesinde artış rapor etmiştir. Trombosit zengin plazma invitro ortamda fetal osteoblast benzeri hücrelerin rejenerasyon ve fonksiyonelliğini arttırıp, mezenkimal kök hücrelerin ortama göçünü sağlamaktadır.⁷⁶ Gruber de trombositlerin periost kaynaklı hücrelere kemotaktik olduğunu göstermiştir.⁶³ Aghaloo ve Butterfield gibi araştırmacılar ise kemik greftleriyle yaptıkları deneysel hayvan çalışmalarında TZP'nin

üstünlüğünü gösterememişlerdir.^{5,51} Fakat oral ve maksillofasiyal cerrahide, osteointegrasyon için kullanılan otojen greftlere kemik doku ilerlemesini hızlandığını bildiren araştırmacılar mevcuttur ve maksiller antroplastide kemik greftleriyle birlikte kullanımında başarılı sonuçlar bildirilmiştir.^{12,154,155,160} Trombositlerin içerdiği büyüme faktörlerinin hem periost ve osteoblastlar, hem de osteoblast benzeri hücreler üzerinde mitojenik etkisi olduğu⁷⁶ ve TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini arttırdığı gösterilmiştir.¹⁴⁰ Kemikleşmeye ve yara iyileşmesine katkıları nedeniyle lumbar spinal füzyon hastalarında otogreft ve hidroksiapatitle birlikte kullanılmış ve başarılı sonuçlar yanında olumsuz sonuçlar da rapor edilmiştir.^{10,27}

Kawase ve Okuda'nın 2003 yılında TZP'nin periodontal ligamentte kollajen sentezini ve in vitro osteoblastik aktiviteyi arttırdığını göstermelerinden sonra Huang ve arkadaşları gingival çekilmelerde koronal ilerletme flebine TZP uygulaması yapmışlar fakat istatistiksel olarak anlamlı bir iyileşme artışı saptayamamışlardır.^{78,118}

Daha önceden Siebrecht ile birlikte TZP'nin poröz hidroksiapatit içine kemik ilerlemesini ve kemik oluşumunu arttırdığını gösteren Aspenberg, sıçan aşıl tendonunda TZP uygulanan tendon defektinin tendon kopma kuvvetinde ve tendon kallusunda artış saptamıştır. Ligamanlar üzerinde de benzer etkileri saptanmış ve artroskopik cerrahide kullanımı önerilmiştir.¹³⁵

Oftalmolojik cerrahide maküler deliklerin kapatılmasında başarılı sonuçlar bildirilmiş,⁵⁶ tavşanlarda yapılan deneysel bir çalışmada da retinal yaralanmalarda hücrel cevabı arttırdığı gösterilmiştir.¹⁰ Fakat bir başka araştırmacı, Paques, uzun dönemde iyileşmiş olan deliklerin tekrar açıldığını rapor etmiştir.¹⁷²

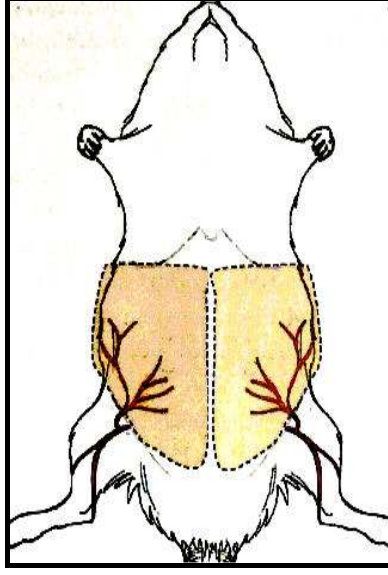
Man, hem TZP hem de fibrin yapıştırıcıyı yüz germe, boyun germe, meme küçültme gibi ameliyatlarda kullanmış ve operasyon süresinde kısılma, dren koyma ihtiyacında, baskılı pansuman kullanımında, seroma oluşumunda, hastanın postoperatif şişlik ve ağrı şikayetlerinde azalma rapor etmiştir.⁹⁸

Teknolojik ilerlemeler sayesinde bazı cihazlar yardımıyla tüm kan hücrelerini, dolayısıyla trombositleri de steril şartlar altında izole ve konsantre etmek mümkündür. Çelişkili sonuçlar yeterli kontrollü çalışmalarla aydınlatıldığı takdirde, bireyin kendi kanından elde edildiği için immün reaksiyon gözlenmemesi, herhangi bir yan etki oluşmaması, ve gerektiğinde aynı hastadan herhangi bir sorun çıkmadan tekrar elde edilebilmesi, otolog olarak elde edildiği için hastalık bulaştırma riski olmaması kullanımının yaygınlaşmasını sağlayacak en önemli faktörlerdendir.^{98,165}

KASIK FLEBİNİN (İNERİOR EPİGASTRİK FLEP) ANATOMİSİ

Sıçan kasık (inferior epigastrik) flebi, mikrocerrahi eğitiminde ve bir çok deneysel çalışmada en sık kullanılan flep modelidir. Süperfisiyal epigastrik damarlar tarafından beslenen bu flebin dikey sınırları ortada ksifoiden pubise çizilen çizgi ile yanlarda koltukaltı çizgileri, yatay sınırları ise süperiorda kosta kavsi, inferiorda inguinal ligamanın oluşturduğu dörtgen şekilli deri bölgesidir (**Şekil 6**). Flep boyutu sıçanın büyüklüğüne, cerrahın tercihin ve çalışmanın gereklerine göre tasarlanabileceği için standart bir ölçü vermek uygun olmaz.

Strauch ve Murray tarafından 1967’de tanımlanmış olan bu flebin değişik boyutlarda modifikasyonlarının tariflenmesine bağlı ortaya çıkan tutarsızlıkları gidermek için Petry ve Wortham 1984’te bir çalışma yapmış ve değişken olan flep lateral sınırını damar anatomisine göre yeniden tariflemişlerdir.¹⁵



Şekil 6: Kasık flebi ve sağ inguinal bölgeden flebe giren süperfisiyal epigastrik damarların şematik görünümü (Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, İstanbul 2005, 443-489).

Kolay diseksiyon sonrası mikrocerrahiye uygun damarlara ulaşılabilmesi, inferior epigastrik sinirden dallanan bir duyusal sinir ağına sahip olması, büyük bir deri adasının güvenle beslendiğinin bilinmesi nedeniyle daha sık tercih edilmektedir.

Sıçanın uygun pozisyonda tespiti ve flep sınırlarının çiziminden sonra üst, medial ve lateral flep sınırları karın duvarı kaslarına kadar ‘pannikulus karnosus’u da dahil ederek kesilir. Flep içinde dağılan damarlar ve pedikül flebin alt yüzünde görülüp pedikül ve lateralde yağlı doku içindeki dallarının yaralanması engellenebilir. Alt sınır kesisi pedikülü güvenceye almak için, kasık yağ yastığı flepte bırakılarak kontrollü şekilde yapılabilir. Her tarafı iyi beslendiği için pedikül hasarlanmadığı takdirde tüm flep yaşar.¹⁵

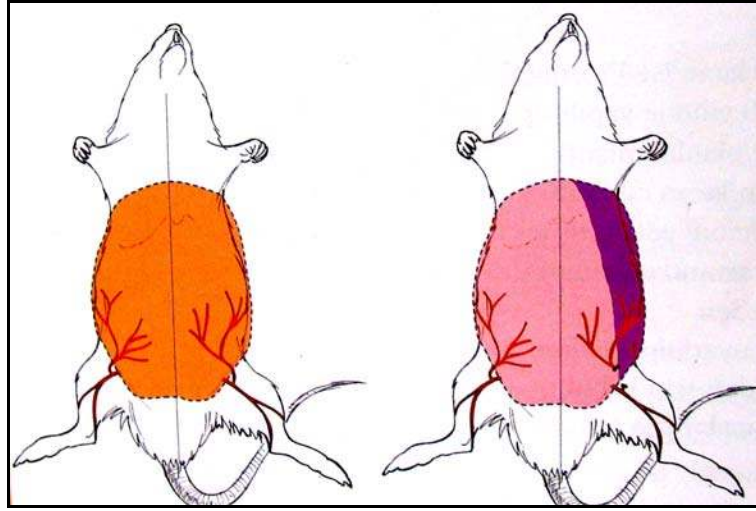
KARIN FLEBİNİN ANATOMİSİ

Süperfisiyal epigastrik damarlar sıçanda karın derisinin kanlanmasını sağlayan majör kaynaklardır. Süperfisiyal epigastrik damarlar bilateral korunduğunda tüm karın derisi yaşayabilir, tek taraflı bağlanıp kesildiğinde o taraftaki karın derisi dolaşımı sağlam pediküllü tarafa bağımlı hale gelir. Tüm karın derisi tek pedikül üzerinde flep olarak hazırlandığında damarı bağlanmış olan karın yarımının laterali nekroza gider. Bu nedenle bu damarların beslediği deri adası içinde hazırlanan flepler, flep dolaşımının, flep geciktirilmesinin ya da flep sağ kalımının değerlendirilmesinde iyi bir model oluşturmaktadır.^{4,42}

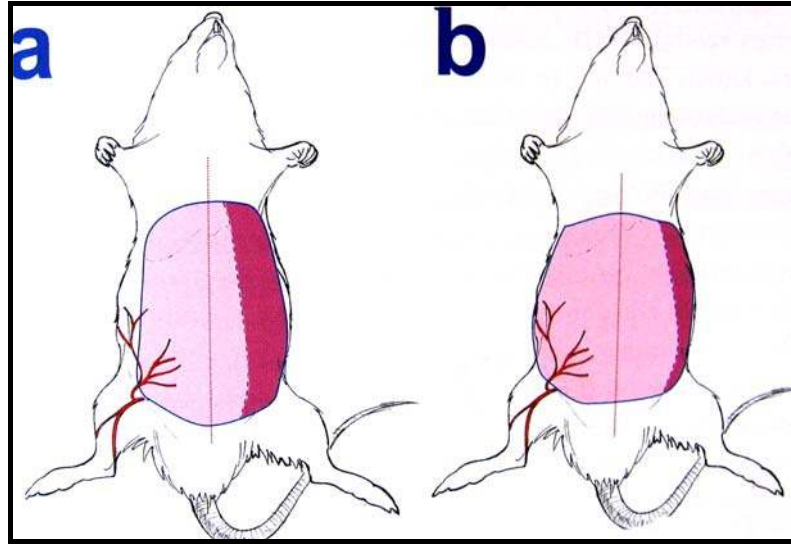
1978 yılında “geciktirme fenomeni” çalışmaları için Finseth ve Cutting⁴⁷ tarafından 9 X9 cm boyutlarında tariflenmiş; fakat küçük hayvanlarda bu boyutlara ulaşmak mümkün olmadığı için standardizasyon için anatomik noktalar belirlenmiş ve buna uygun flep dizaynı tavsiye edilmiştir.⁴² Dikey sınırları yanlardaki koltukaltı çizgileri, yatay sınırları ise süperiorda kosta kavsi inferiorda inguinal ligaman tarafından oluşturulan kare şekilli deri bölgesidir (**Şekil 7**).

Flebin her iki dikey ve superior yatay kenarları karın duvarı kaslarına kadar pannikulus karnozusu da içerecek şekilde kesildikten sonra alt sınıra kadar diseksiyona devam edilip bağlanıp kesilecek süperfisiyal epigastrik damarın olduğu tarafta alt yüzden damarlar rahatlıkla takip edilip kesilebilir. Kaudal kenarın kalan kısmı makas yardımıyla dikkatle kesilirse pedikülün kesilmesi de önlenabilir.

Çeşitli çalışmalarda nekroz alanları farklı bulunduğu için 1997’de Padubidri ve Brown damar anatomisini inceleyip lateral dal bağlandığında ortalama %30, bu dal korunduğunda ortalama %13,5 nekroz geliştiğini göstermişlerdir (**Şekil 8**).¹⁵ Böylece flep damarlarını iyi diseke ederek belli standartta flepler oluşturmak mümkün olmuştur.¹²²



Şekil 7: Karın flebi ve sağ inguinal bölgeden flebe giren süperfisiyal epigastrik damarların şematik görünümü (Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, İstanbul 2005, 443-489).



Şekil 8: Flep tek pedikül üzerinde kaldırıldığında kontralateral kranial kısmı random dolaşımli bir uzantı halini alır. Bu nedenle bu bölgenin lateralinde, süperfisiyal epigastrik arterin lateral dalı flebe dahil edilmediğinde %30 (a) ve dahil edildiğinde %13,5 (b) oranında nekroz beklenir (Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, İstanbul 2005, 443-489).

Fleplerde gelişen nekrozların sınırları bir hafta içinde kendisini belli ettiği için genellikle flep takipleri bir hafta yapıp nekroz yüzdeleri bu sürenin sonunda belirlenir ve yorumlanır.¹⁵

Bu çalışmanın kasık flepleri kullanılarak yapılan birinci kısmında pedikül ayırma zamanını kısaltmaya yönelik TZP uygulamasının etkisi, karın flebi kullanılarak yapılan ikinci kısmında geciktirme etkisinin TZP kullanılarak farmakolojik olarak sağlanabilirliğinin araştırılması amaçlanmıştır.

III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Gazi Üniversitesi Rektörlüğü Deney Hayvanları Etik Kurul Başkanlığı'nın onayı alınarak, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Laboratuvar Hayvanları Yetiştirme ve Deneysel Araştırmalar Merkezi'nde gerçekleştirildi. Çalışmada, ağırlıkları 300-350 gram arasında değişen, 63 adet Wistar tipi erkek sıçan kullanıldı. Sıçanlar uygun kafeslerde, 22 ± 2^0 C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanların beslenme ihtiyaçları standart laboratuvar yemi ve su verilerek düzenli olarak karşılandı.

Tüm cerrahi işlemler %10'luk ketamin HCl (50 mg/kg- Alfamine®-IM) ve ksilazin HCl (2,5 mg/kg- Rompun®-IM) anestezisi altında, aynı cerrah tarafından steril koşullarda gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrası dönemde sıçanların kendilerine zarar vermelerini önlemek amacıyla, hayvanlara Bayramiçli ve arkadaşlarının tarif ettiği gibi¹⁶ röntgen filmi ve flasterden hazırlanan özel bir yelek giydirildi ve hayvanlar ayrı kafeslerde tutuldu. Günlük bakımları sırasında insizyonlarına povidone iyot ile pansuman yapılan hayvanların ağrılarını engellemek için fluniksin (1,1 mg/kg - Fluvil®-IM) enjeksiyonları yapıldı. Hayvanların hiçbirisinin yara yerinde enfeksiyon gelişmedi. Ölüm veya otomutilasyon nedeniyle çalışma dışı kalan sıçanların yerine aynı işlemlerin gerçekleştirildiği yeni sıçanlar konularak grupların planlanan sayıları korundu.

TROMBOSİT ZENGİN PLAZMANIN HAZIRLANMASI

Trombositlerin diğer kan elemanlarından ayrılıp bir miktar plazma ilave edilerek TZP haline getirilebilmesi için gerekli olan kan, donör olarak seçilen 15 adet sıçandan, Ketamine-

HCl (Alfamine®-IM) ve Ksilazin HCl (Rompun®-IM) karışımı ile sağlanan anestezi altında intrakardiyak kanülizasyon ile tüm vücut kanları alınarak elde edildi.

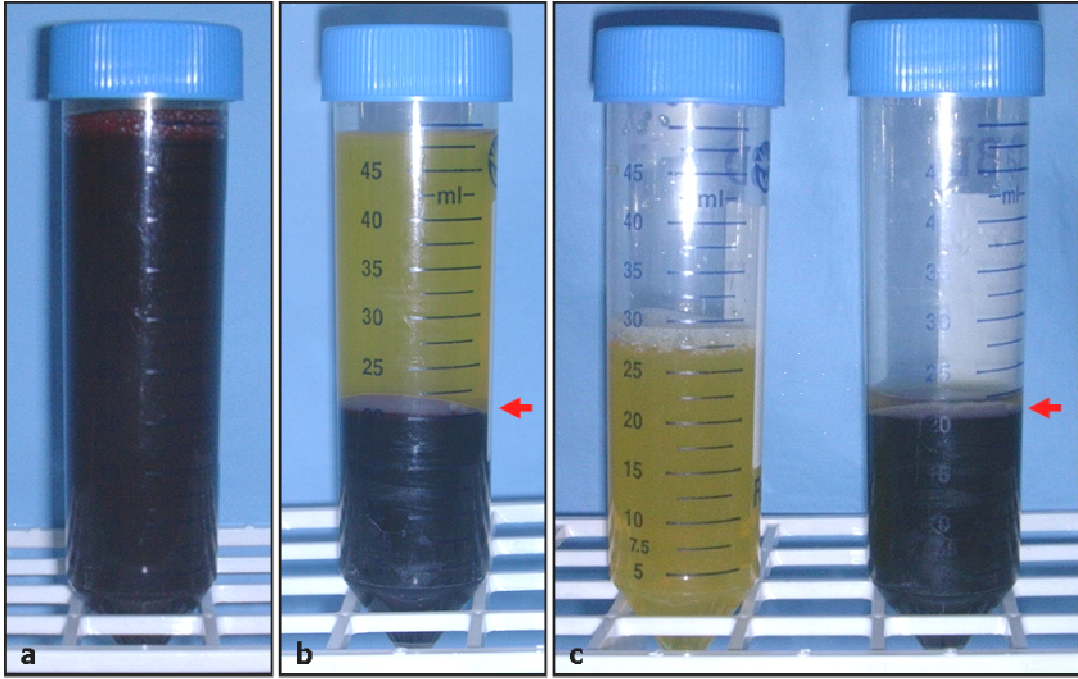
Elde edilen 150 ml kan, pıhtılaşmasını engellemek için sitrat-fosfat-dekstrozu (CPD) solüsyonu ile, 5 ml kan/1 ml CPD oranında karıştırılarak santrifüj işlemi için uygun olan dört plastik tüp içerisinde toplandı. Bizim kullandığımız CPD solüsyonu kan merkezlerindeki üçlü kan torbaları (Baxter Healthcare Corp, USA) içerisinden elde edildi.

Toplanan kan 22°C sıcaklıkta ve 200 g devirde santrifüj cihazında (Heraeus Cryofuge 6000i, Kendo Laboratory Products) 20 dakika boyunca santrifüje tabi tutuldu. Üstte toplanan açık sarı renkli plazma ile en alttaki kırmızı tabaka arasında ince bir ara tabaka (buffy coat) izlendi (**Şekil 9**). Üzerindeki plazmayla beraber bu ara tabaka ayrı bir tüpe alındı. Bu tüp ikinci kez 480 g devirde 20 dakika boyunca santrifüj edildi. Bu işlem sonunda trombosit fakir plazmanın en üstte toplandığı görüldü (**Şekil 10**). Oluşan trombosit konsantresi ve trombosit fakir plazma (= fibrin yapıştırıcı= FY) ayrıştırılıp farklı tüplere alındı. Trombosit konsantresi $1,5 \times 10^{12}$ trombosit/Lt olacak şekilde FY ile seyreltilti. Yapılan analizle trombositlerin üç kat konsantre edildiği saptandı ($0,3-0,8 \times 10^{12}$ / $1,5 \times 10^{12}$ trombosit/Lt).

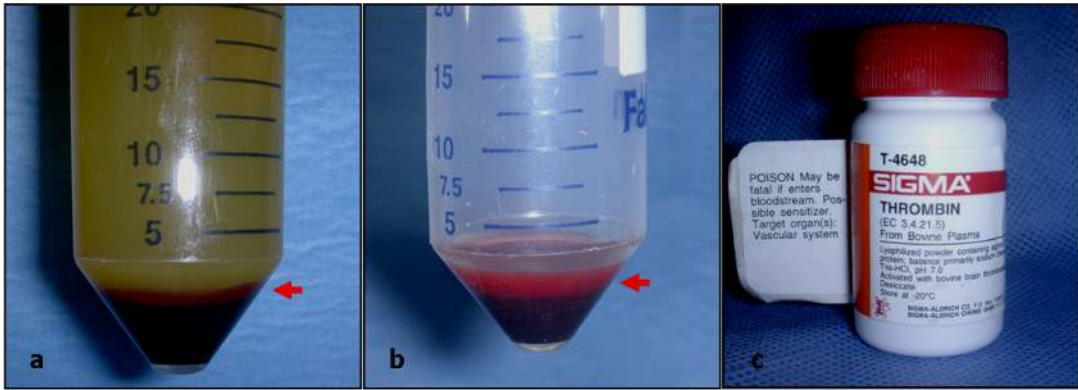
Elde edilen trombosit zengin plazma, içerisinde lökositleri de barındırdığından ve çalışmada her bir hayvana otolog ürün kullanımı mümkün olmadığından “graft versus host” reaksiyonunu azaltmak amacıyla 25 Gy ile ışınlanarak lenfosit inaktivasyonu sağlandı.

Trombosit zengin plazma, sığır kaynaklı trombin preparatı (Thrombin, Sigma-Aldrich, Almanya) ile aktive edildi. 1000 ünite toz halinde trombin içeren ürün, 10 ml %10'luk kalsiyum klorür ile karıştırılarak 100 ünite/ml oranında trombin solüsyonu elde edildi.

Çalışma sırasında TZP'nin 1 ml'sine 10ü trombin solüsyonu ilave edilerek aktif hale geçmesi ve ortama büyüme faktörlerinin salınımı sağlandı.



Şekil 9: Trombosit zengin plazmanın hazırlanması. **a)** Donör sıçanlardan elde edilen ve antikoagülan solüsyon ilave edilen kan **b)** İlk santrifüj sonrası plazma ve kırmızı kan hücreleri arasında trombositler ve lökositlerin oluşturduğu ince tabaka (işaretli alan) **c)** Plazmanın uzaklaştırılmasından sonra ara tabakanın görünümü.



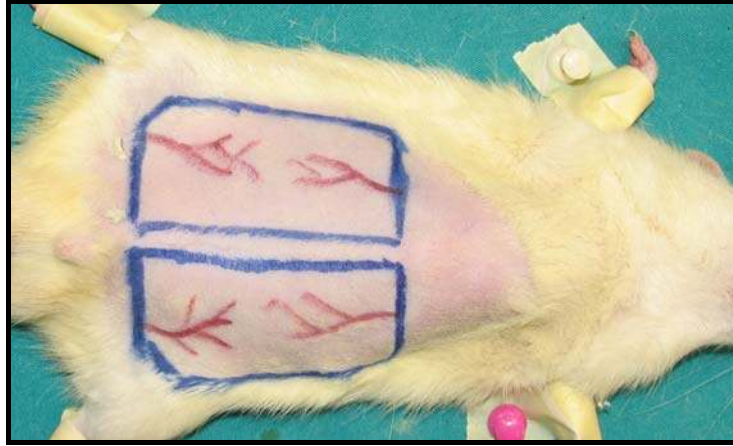
Şekil 10: Trombosit zengin plazma ve fibrin yapıştırıcının hazırlanması. **a)** İkinci santrifüj işlemi sonrasında iki tabaka arasında yer alan trombosit konsantresi (ok) **b)** FY'nın uzaklaştırılmasından sonra eritrositler ve trombosit konsantresi (ok) **c)** TZA'nın aktive edilmesi için kullanılan sığır kaynaklı trombin preparatı.

CERRAHİ TEKNİK

Deneklere, %10'luk ketamin HCl (Alfamine®) (50mg/kg-IM) ve ksilazin HCl (Rompun®) (2,5mg/kg-IM) ile anestezi uygulandı. Karın ve kasık bölgeleri tıraş edildikten sonra sıçanlar supin pozisyonda tespit edildi. Cerrahi alan %10 povidon iodine solüsyon ile temizlendi ve steril olarak örtüldü. Trombosit zengin plazmanın pedikül ayırma zamanına etkilerini incelemek için çalışmanın 1. deney kısmında kasık flebi, TZP kullanarak farmakolojik yollardan geciktirme mekanizmalarının sağlanabilirliğini araştırmak için 2. deney kısmında karın flebi kullanıldı.

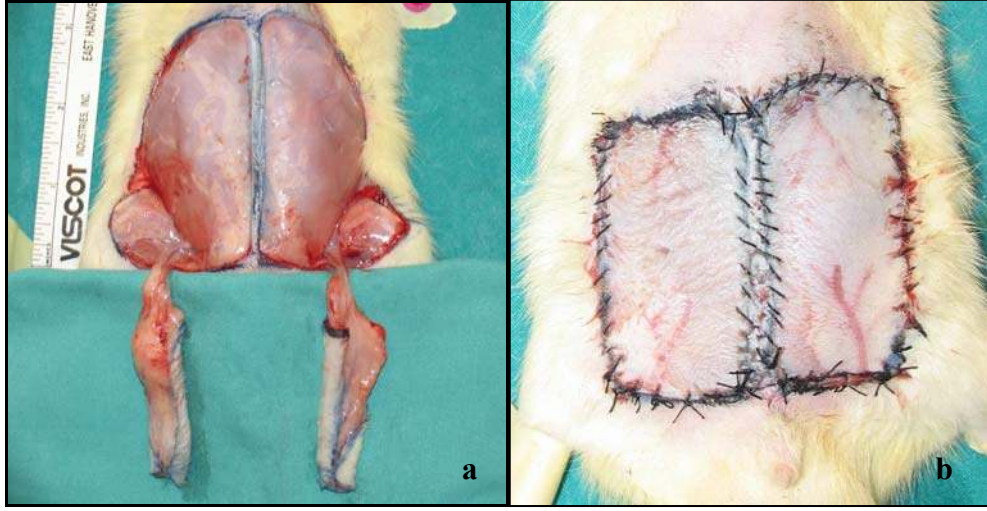
1.DENEY

Karın bölgesinde alt sınırı inguinal ligaman, üst sınırı ksifoid kavsi, lateral sınırı koltukaltı çizgisi ve medial sınırı orta hattın 1-1,5 mm lateralinde ksifoidden pubise uzanan çizgi olan dörtgen şeklinde bilateral flep tasarlandı. Flepler kalıcı cerrahi kalem kullanılarak sıçanların üzerinde işaretlendi (**Şekil 11**).



Şekil 11: Önceden belirlenen noktalar ışığında dikdörtgen şeklinde flepler tasarlandı

Süperfisiyal inferior epigastrik damar tarafından beslenen flep, kraniyalden kaudale doğru kas fasyası üzerinden kaldırıldı. Kasık bölgesinde süperfisiyal inferior epigastrik damar, lateral dalı korunmadan izole edilip aynı işlem karşı tarafa da uygulandı. Uygun cerrahi işlem sonrası cilt 4/0 ipek ile yerine dikildi (**Şekil 12**). Sıçanların kendilerine zarar vermelerini önlemek amacıyla her birine flaster ve röntgen filminden hazırlanan yelek giydirildi (**Şekil 15**).



Şekil 12: a: Bilateral epigastrik flep pedikülleri, b: Flep yerine iade edildikten sonraki hali

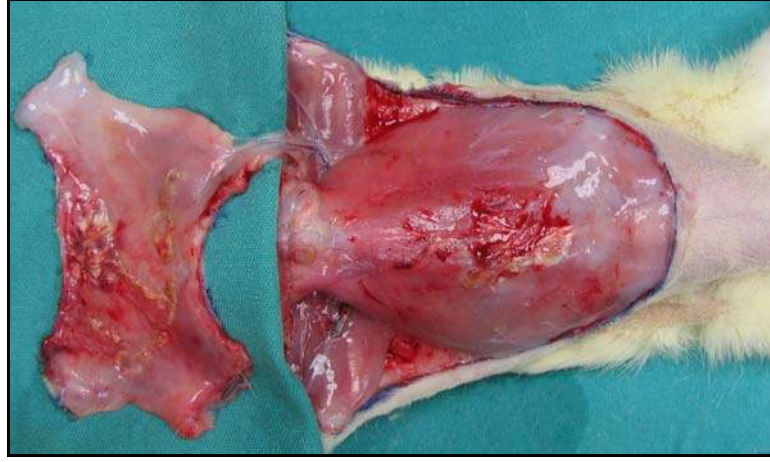
2. DENEY

Cerrahi işlemden bir hafta önce sıçanların karın bölgelerinde flep kaldırılması planlanan alana, gruplarına göre SF, trombin, TZP ve FY enjeksiyonları yapıldı. Bir hafta sonra karın bölgesinde alt sınırı inguinal ligaman, üst sınırı ksifoid kavsi, lateral sınırları koltukaltı çizgileri olan kare şeklinde flep tasarlandı. Flepler yukarıdaki anatomik belirleyicilere uygun olarak kalıcı cerrahi kalem kullanılarak sıçanların üzerinde işaretlendi (**Şekil 13**).

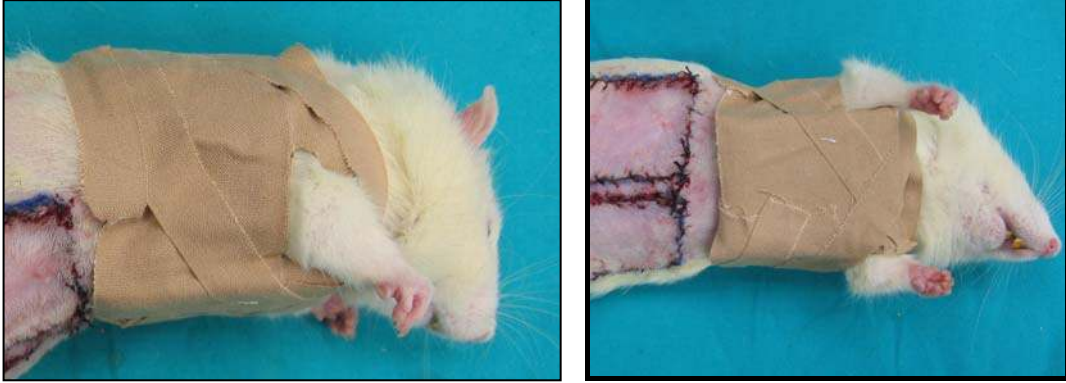


Şekil 13: Önceden belirlenen noktalar ışığında kare şeklinde flep tasarlandı

Daha sonra, her iki süperfisiyal inferior epigastrik damarlar tarafından beslenen flep, kraniyalden kaudale doğru kas fasyası üzerinden kaldırıldı. Her iki kasık bölgesinde süperfisiyal inferior epigastrik damarlar izole edildikten sonra sol taraftaki pedikül damar klipsiyle bağlandı, flep sadece sağ süperfisiyal inferior epigastrik pedikül tarafından beslenen bir ada flebi haline getirildi (**Şekil 14**). Gruplara uygun cerrahi işlem tamamlandıktan sonra cilt 4/0 ipek ile yerine dikildi. Sıçanların kendilerine zarar vermelerini önlemek amacıyla her birine flasterden ve röntgen filminden hazırlanan yelek giydirildi (**Şekil 15**).



Şekil 14: Sağ süperfisiyal epigastrik arter bazlı hazırlanmış karın flebi



Şekil 15: Sıçanların kendilerine zarar vermelerini önlemek amacıyla flaster ve röntgen filmi kullanılarak hazırlanan yelek

ÇALIŞMA GRUPLARI

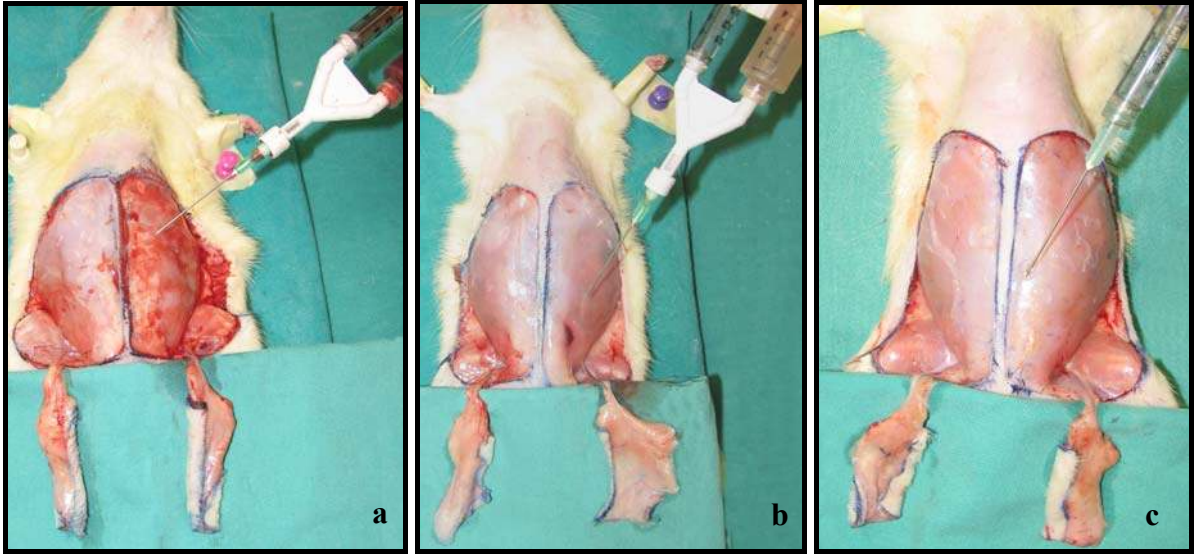
1. DENEY

24 adet sıçanda bilateral kasık flebi hazırlandı. Her hayvandaki hazırlanmış olan iki flepten sağdaki kontrol, soldaki deney grubu olarak kullanıldı. Sağdaki flepler kaldırıldıktan sonra hiçbir işlem yapılmadan yerine iade edildi. Soldaki flepler yerlerine iade edilmeden önce flep yatağına uygulanan maddelere göre üç gruba ayrıldı.

Grup I (n=8): TZP grubu (Şekil 16a).

Grup II (n=8): FY grubu (Şekil 16b).

Grup III (n=8): Trombin grubu (Şekil 16c).



Şekil 16: a: Soldaki kasık flebinin altına TZP uygulanması, b: Soldaki kasık flebinin altına FY uygulanması, c: Soldaki kasık flebinin altına trombin uygulanması

Bir hafta sonra bilateral tüm fleplerin inferior insizyonlarının 1 cm'lik kısmı açılarak pediküller bulundu, bağlanarak kesildi (Şekil 17).



Şekil 17: Bir hafta sonra bulunan ve bağlanan pediküller.

Grup I (n=8)

Sağ ve sol süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde ayrı ayrı kaldırılan fleplerden sağdakiler herhangi bir ek girişim yapılmaksızın yerlerine iade edildi. Soldaki flep yatağına hazırlanmış olan TZP ve trombin solüsyonu (1,25 ml ve 0,125 ml= 12,5 ü) douflo sistemiyle uygulandı. Bir hafta sonra fleplerin inferior insizyonlarının 1 cm'lik kısımları açıldıktan sonra pediküller damar klipsleri ile bağlanarak kesildi. Pediküller bağlandıktan bir hafta sonra değerlendirme için hayvanlar sakrifiye edildi.

Grup II (n=8)

Sağ ve sol süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde ayrı ayrı kaldırılan fleplerden sağdakiler herhangi bir ek girişim yapılmaksızın yerlerine iade edildi. Soldaki flep yatağına hazırlanmış olan FY ve trombin solüsyonu (1,25 ml ve 0,125 ml= 12,5 ü) duoflo

sistemiyle uygulandı. Bir hafta sonra fleplerin inferior insizyonlarının 1 cm'lik kısımları açıldıktan sonra pediküller damar klipsleri ile bağlanarak kesildi. Pediküller bağlandıktan bir hafta sonra değerlendirme için hayvanlar kurban edildi.

Grup III (n=8)

Sağ ve sol süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde ayrı ayrı kaldırılan fleplerden sağdakiler herhangi bir ek girişim yapılmaksızın yerlerine iade edildi. Soldaki flep yatağına hazırlanmış olan trombin solüsyonu (0,125 ml= 12,5 ü) uygulandı. Bir hafta sonra fleplerin inferior insizyonlarının 1 cm'lik kısımları açıldıktan sonra pediküller damar klipsleri ile bağlanarak kesildi. Pediküller bağlandıktan bir hafta sonra değerlendirme için hayvanlar kurban edildi.

2. DENEY

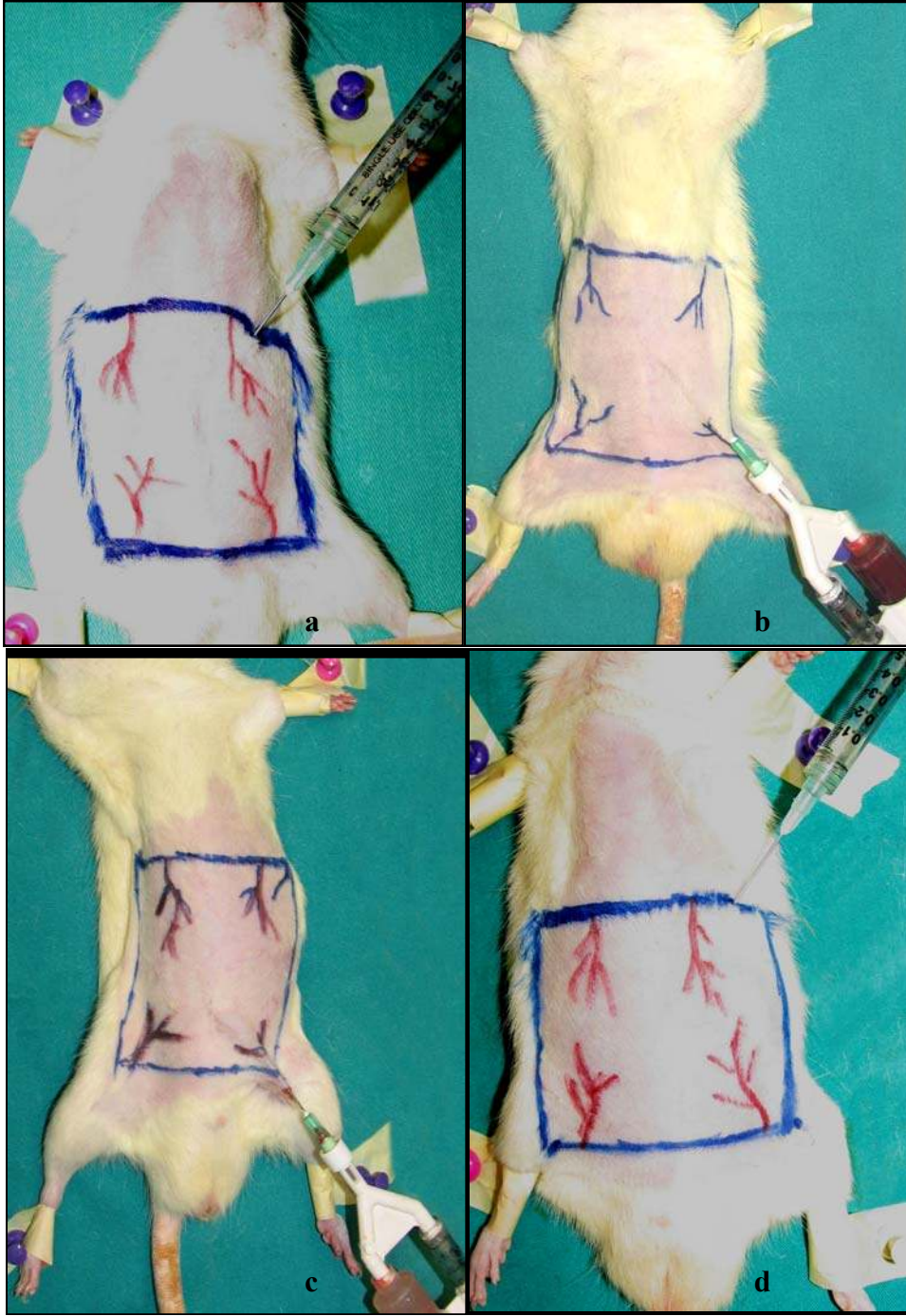
24 adet sıçanda dört ayrı grup oluşturuldu. Bu grupta karın flebi kaldırılması planlanan kare şeklindeki alanın “panniculus carnosus” dokusu altına cerrahi işlemle bir hafta önce uygulanan maddelere göre yapıldı.

Grup I (n=6): SF grubu (Şekil 18a).

Grup II (n=6): TZP grubu (Şekil 18b).

Grup III (n=6): FY grubu (Şekil 18c).

Grup IV (n=6): Trombin grubu (Şekil 18d).



Şekil 18: a: Flep alanına SF uygulanması b: Flep alanına TZP + trombin uygulanması c: Flep alanına FY + trombin uygulanması, d: Flep alanına trombin uygulanması

Grup I (n=6)

Tek taraflı süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde kaldırılması planlanan kare şeklindeki flep bölgesindeki pannikulus karnozus dokusu altına 2,5 ml serum fizyolojik (SF) 21G enjektörlerle infiltre edildi. Bir hafta sonra karın flebi sağ taraf pedikülü sağlam olacak şekilde anatomik tanıma uygun şekilde kaldırıldı. Cerrahi işlemden bir hafta sonra değerlendirme için hayvanlar yüksek doz fenobarbütal ile sakrifiye edildi.

Grup II (n=6)

Tek taraflı süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde kaldırılması planlanan kare şeklindeki flep bölgesindeki pannikulus karnozus dokusu altına TZP ve trombin solüsyonu (2,5 ml ve 0,25 ml= 25 ü) duoflo sistemiyle infiltre edildi. Bir hafta sonra karın flebi sağ taraf pedikülü sağlam olacak şekilde anatomik tanıma uygun şekilde kaldırıldı. Cerrahi işlemden bir hafta sonra değerlendirme için hayvanlar yüksek doz fenobarbütal ile sakrifiye edildi.

Grup III (n=6)

Tek taraflı süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde kaldırılması planlanan kare şeklindeki flep bölgesindeki pannikulus karnozus dokusu altına FY ve trombin solüsyonu (2,5 ml ve 0,25 ml= 25 ü) duoflo sistemiyle infiltre edildi. Bir hafta sonra karın flebi sağ taraf pedikülü sağlam olacak şekilde anatomik tanıma uygun şekilde kaldırıldı. Cerrahi işlemden bir hafta sonra değerlendirme için hayvanlar yüksek doz fenobarbütal ile sakrifiye edildi.

Grup IV (n=6)

Tek taraflı süperfisiyal inferior epigastrik damarlar üzerinde kaldırılması planlanan kare şeklindeki flep bölgesindeki pannikulus karnozus dokusu altına trombin solüsyonu (2,5 ml SF ve 0,25 ml= 25 ü) 21G enjektörlerle infiltre edildi. Bir hafta sonra gruptaki tüm hayvanlarda karın flebi kaldırılması planlanan alanın nekroza gittiği görüldü ve bu nedenle flepler kaldırılamadı.

DEĞERLENDİRME YÖNTEMLERİ

A. GENEL DEĞERLENDİRME

Deneysel çalışmaya dahil edilen hayvanlarda deney süresince oluşan genel değişiklikler her gün gözlemlendi. Postoperatif dönemde ağrıları olmaması için 2 gün boyunca flunixin (1,1 mg/kg - Fluvil®-IM) enjeksiyonları yapıldı. Sıçanların kendilerine zarar vermelerini önlemek için giydirilen ve hasar gören yelekler düzeltildi. Yara yerlerine postoperatif iki gün boyunca günde iki kez olacak şekilde %10'luk povidon iodine solüsyonu ile pansuman yapıldı.

B. FLEP NEKROZ ALANI

Tüm gruplarda cerrahiden sonraki 7. günde nekroz alanları değerlendirildi. Bunun için tüm hayvanlar sakrifiye edilerek supin pozisyonda sabitlendi. Daha sonra, standart yöntem kullanılarak dijital fotoğraf makinesi (Power Shot Pro 1, Canon Inc, Japonya) aracılığıyla, yanlarına bir cetvel konularak fleplerin fotoğrafları çekildi. Çekilen fotoğraflar bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra Image Tool 3.0 programı yardımıyla, tüm flep alanı, nekroz alanı

ve sağ kalan flep alanı ölçüldü. Yara iyileşmesi ve nekrozla beraber görülen flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanı, toplam flep alanının yüzdesi olarak değerlendirmeye alındı (Şekil 19).



Şekil 19: a: 1. Deneyde b: 2. Deneyde nekroz ve yara iyileşmesinin yol açtığı flep kontraksiyonu nedeniyle nekroz alanının yüzdesi değerlendirildi.

C. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

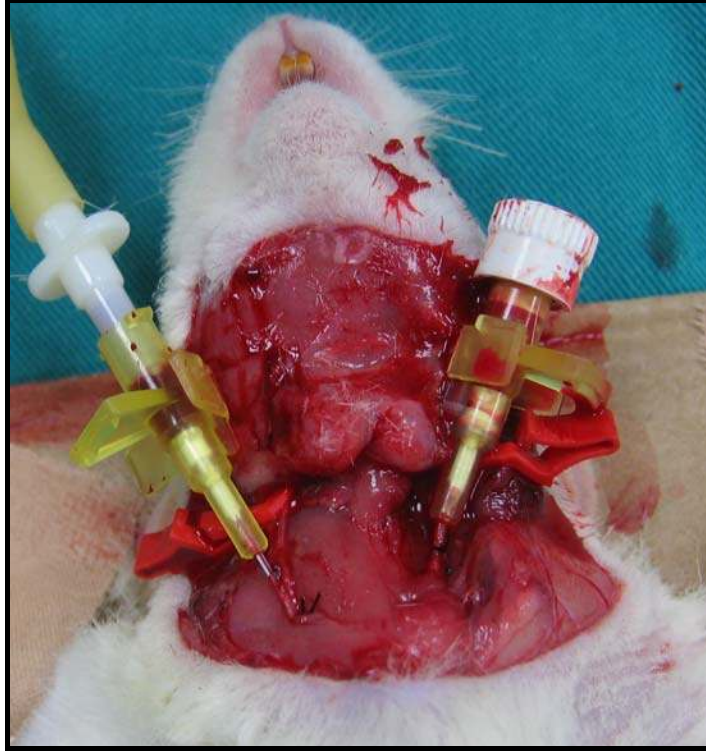
Tüm gruplarda 1 cm çapında biyopsi örnekleri alındı. Alınan dokular %10'luk formaldehit solüsyonuna konularak tespit edildi. Beş mikron kalınlığında alınan kesitler, rutin protokole uygun olarak doku takip işlemine tabi tutuldu. Daha sonra, dokular rutin mikroskopik inceleme için Hematoksilen Eozin (HE) ile boyandı. Kollajen liflerini değerlendirebilmek için Masson Trikrom boyaması yapıldı. Bu boyamalar sonucunda, dokular Olympus BH2 ışık mikroskobu altında spesimenlerin hangi gruplara ait olduğunu bilmeyen aynı histolog tarafından incelendi ve her grup için genel subjektif değerlendirme

yapılarak epidermis, dermis, dermal vasküler yapılar ve dermoepidermal bileşkede görülen değişiklikler kaydedildi.

D. MİKROANJİOGRAFI

İkinci deneyin 4. grubu hariç her gruptan toplam ikişer deneğe mikroanjiyografi yapıldı. Yaşayan deri alanının hesaplanabilmesi için mikroanjiyografiler fotoğraflar çekildikten sonra gerçekleştirildi (Cerrahi işlemlerden bir hafta sonra).

Sıçanların servikal derileri eksize edildikten sonra, sağ tarafta eksternal juguler ven, solda karotis kommunis arteri diseke edilip her ikisi de 24G intraket ile kanüle edildikten sonra ipek bağlamalarla sıkıca tespit edildi (**Şekil 20**). Heparinli (100 IU/ml) izotonik ılık serum daha önceki çalışmalarda tarif edildiği gibi^{6,44} kuvvetli basınç uygulamadan, pulsatil şekilde arterden verilmeye başlandı ve ven tarafındaki kanülden önce kan sonra kanla karışık serum geldiği görüldü. Venden gelen sıvı berraklaşana kadar (ortalama 100 ml sıvı kullanarak) damar yatağının heparinli serum ile yıkanmasına devam edildi. Sıvı berraklaştıktan sonra serum fizyolojik ile seyreltilmiş ve ısıtılmış %30'luk baryum sülfat solüsyonu yine düşük basınçla ve pulsatil şekilde arter tarafından infüze edildi. Ven tarafından baryum sülfatın geldiği görüldükten sonra da damar yatağını tam olarak doldurmak için infüzyona bir süre devam edildi. Ortalama 70 ml baryum sülfat kullanıldı. Kanüle edilen damarlar bağlandıktan sonra sıçanlar + 4 °C'de buzdolabında muhafaza edildi. 24 saat sonra karın ön duvarı flep bölgelerini de içerecek şekilde rektus kas fasyası üzerinden ayrıldı ve mamografi cihazı (GE Medical System, Senographe DMR) ile 66 cm mesafeden 25 kV ve 5 mA ayarlarında grafileri çekildi.



Şekil 20: Mikroanjiyografik görüntü elde etmek için damar yatağını Baryum Sülfat ile doldurabilmek amacıyla sağ tarafta eksternal juguler ven, sol tarafta karotis kommunis arteri diseke edilip her ikisi de 24 gauge intraket ile kanüle edildikten sonra 6/0 ipek bağlamalarla sıkıca tespit edildi.

E. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME

Birinci deneydeki grupların flep nekroz oranlarının karşılaştırılmasında Wilcoxon Eşleştirilmiş İki Örnek ve Mann-Whitney U testleri, 2. Deneydeki grupların flep nekroz oranlarının karşılaştırılmasında Kruskal Wallis ve Mann-Whitney U testi kullanıldı. $p < 0,05$ anlamlı olarak kabul edildi.

IV. BULGULAR

A. GENEL DEĞERLENDİRME BULGULARI

Birinci deney için ameliyat edilen sıçanlardan Grup I'den ve Grup II'den birer denek ilk ameliyattan sonraki bir haftalık dönemde enfeksiyondan kaybedildi.

İkinci deney için ameliyat edilen sıçanlardan Grup 1'den 2 tanesi Grup 2'den 1 tanesi ve Grup 3'ten 1 tanesi ilk ameliyattan sonraki bir haftalık dönemde enfeksiyondan kaybedildi. Grup 4' te hiç kayıp olmadı fakat trombin enjeksiyonu sonrası flep kaldırılması planlanan alanların tümünde nekroz olduğu için bu sıçanlara karın flebi yapılamadı. Deney gruplarından eksilen hayvanların yerine yeni sıçanlarda aynı işlemler uygulanarak sabit denek sayısı korundu.

B. FLEP NEKROZ ALANI DEĞERLENDİRME BULGULARI

1. DENEY

Ameliyattan sonra 7. günde fleplerin nekroz alanları değerlendirildiğinde:

1. Deney grup I'de sağdaki kontrol fleplerinin ortalamasının $\%22,5 \pm 1,6$; soldaki TZP ve trombin uygulanan fleplerin ortalamasının $\%14,8 \pm 0,9$ olduğu,

Grup II'de sağdaki kontrol fleplerinin ortalamasının $\%23,3 \pm 1,5$; soldaki FY ve trombin uygulanan fleplerin ortalamasının $\%18,1 \pm 1,1$ olduğu,

Grup III'te sağdaki kontrol fleplerinin ortalamasının $\%23,5 \pm 1,8$; soldaki trombin uygulanan fleplerin ortalamasının $\%61,8 \pm 3,3$ olduğu ölçüldü (**Tablo 2, 3; Şekil 21, 23**).

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Kruskal Wallis testi yardımıyla belirlendi. Daha sonra her grup Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile birbirleriyle karşılaştırıldı:

Grup I’de TZP uygulanan sol tarafta nekroz alanının kontrol flebi olan sağa göre belirgin derecede azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,012$),

Grup II’de FY uygulanan sol tarafta nekroz alanının yine kontrol flebi olarak kullanılan sağa göre belirgin derecede azaldığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,012$),

Grup III’te trombin uygulanan sol tarafta nekroz alanının sağa göre belirgin derecede arttığı ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,012$),

TZP uygulanan tarafın nekroz alanı (Grup I sol) ile FY uygulanan tarafın nekroz alanı (Grup II sol) karşılaştırıldığında TZP uygulanan tarafta nekroz alanının FY uygulanan taraftan istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu ($p<0,0001$),

TZP uygulanan tarafın nekroz alanı (Grup I sol) ile trombin uygulanan tarafın nekroz alanı (Grup III sol) karşılaştırıldığında TZP uygulanan tarafta nekroz alanının trombin uygulanan taraftan istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu ($p<0,0001$),

FY uygulanan tarafın nekroz alanı (Grup II sol) ile trombin uygulanan tarafın nekroz alanı (Grup III sol) karşılaştırıldığında FY uygulanan tarafta nekroz alanının trombin uygulanan taraftan istatistiksel olarak anlamlı derecede az olduğu ($p<0,0001$) görüldü.

DENEY I	GRUPLAR					
	I		II		III	
	* Sağ flep	# Sol flep	* Sağ flep	# Sol flep	* Sağ flep	# Sol flep
1	22,4	15,4	22,8	18,9	23,2	59,9
2	20,7	14,3	23,4	17,7	26,0	65
3	22,1	14,5	21,5	18,1	25,7	62,5
4	19,9	16,1	23,0	17,2	22,9	58,4
5	24,1	13,9	24,2	16,6	21,0	60,6
6	23,6	15,7	21,2	18,3	22,5	67,1
7	24,5	15,0	25,8	17,5	21,8	63,3
8	23,0	13,5	24,5	20,3	24,6	58,0
Ort±SD	22,5±1,6	14,8±0,9	23,3±1,5	18,1±1,1	23,5±1,8	61,8±3,3

Tablo 2: 1. Deneyde, pedikül bağlanmasından sonra 7. günde fleplerinin nekrozlu alanlarının toplam flep alanına göre yüzdeleri (%).

* Sağdaki flepler (Tüm gruplarda) - kontrol flebi

Soldaki flepler Grup I - TZP

Grup II – FY

Grup III – trombin uygulanan gruplar olarak işlem görmüştür.

DENEY I		Ortalama nekroz alanı (%)		
Grup	n (sıçan sayısı)	Sağ flep	Sol flep	Minimum- maksimum
Grup I	8	%22,5 ± 1,6	%14,8 ± 0,9	19,9-24,5
Grup II	8	%23,3 ± 1,5	%18,1 ± 1,1	21,2-25,8
Grup III	8	%23,5 ± 1,8	%61,8 ± 3,3	21,0-26,0

Tablo 3: Tüm gruplarda 7 gün sonunda gelişen flep nekrozlarının yüzdeleri.

Her grupta sağda oluşturulan flepler soldakilerin kontrol grubu olarak değerlendirildi:

Grup I' de sol flepte nekroz oranlarında belirgin azalma ($p=0,012$),

Grup II'de sol flepte nekroz oranlarında belirgin azalma ($p=0,012$)

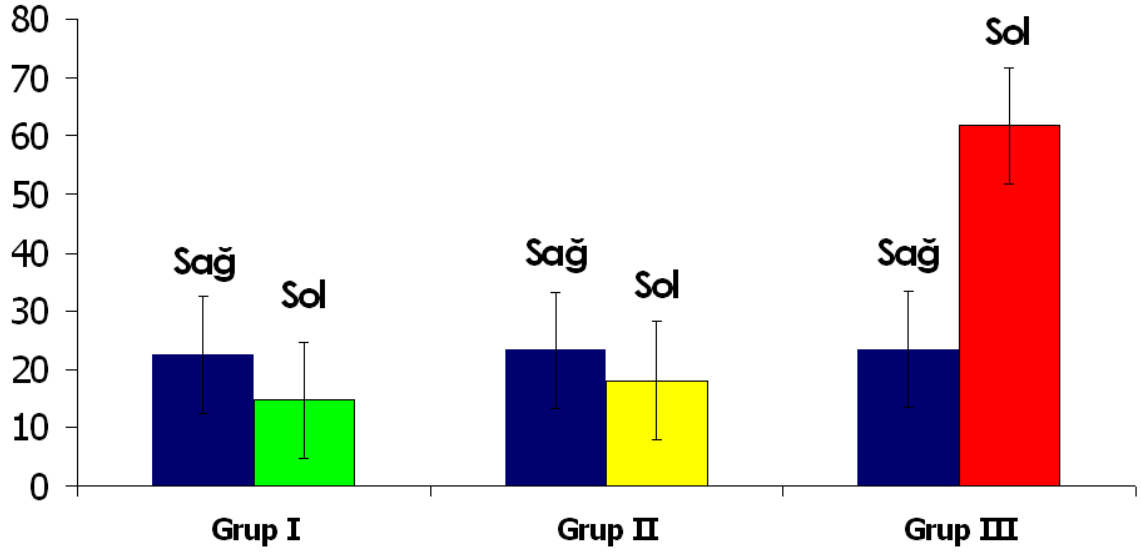
Grup III'te sol flepte nekroz oranlarında belirgin artma ($p=0,012$) saptandı.

Soldaki flepler kendi aralarında kıyaslandığında:

Grup I'in nekroz oranının Grup II'den anlamlı şekilde az olduğu ($p<0,0001$)

Grup I'in nekroz oranının Grup III'ten anlamlı şekilde az olduğu ($p<0,0001$)

Grup II'nin nekroz oranının Grup III'ten anlamlı şekilde az olduğu ($p<0,0001$) saptandı.



Şekil 21: Üstte, 1. Deneyde tüm gruplarda gelişen nekroz alanı yüzdelерinin dağılımı görölmektedir. Grupların kendi içinde kontrol grubu flepleri olduğu için nekroz yüzdeleri her grupta kendi içindeki kontrolüyle Wilcoxon eşleştirilmiş iki örnek testi kullanılarak karşılaştırıldı ve her üç grupta da $p=0,012$ olarak tespit edildi.

2. DENEY

Ameliyattan sonra 7. günde fleplerin nekroz alanları değerlendirildiğinde:

2. Deneyde, altına flep kaldırılmadan önce SF uygulanmış olan fleplerdeki (Grup 1) nekroz ortalamasının $\%29,0 \pm 1,2$

Altına flep kaldırılmadan önce TZP + trombin uygulanmış olan fleplerdeki (Grup 2) nekroz ortalamasının $\%19,4 \pm 1,1$

Altına flep kaldırılmadan önce FY + trombin uygulanmış olan fleplerdeki (Grup 3) nekroz ortalamasının $\%24,8 \pm 1,0$ olduğu görüldü. (**Tablo 4; Şekil 22, 24, 25**).

Grup 4 olması planlanmış olan ve pannikulus karnozus dokusu altına trombin solüsyonu sıkılmış olan sıçanların hepsinin karın derisinde nekroz geliştiği için flepler kaldırılmadı.

Gruplar arasındaki farkın istatistiksel olarak anlamlı olup olmadığı Kruskal Wallis testi yardımıyla araştırıldı ve tüm gruplar arasında belirgin fark olduğu saptandı. Daha sonra her grup Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile birbirleriyle karşılaştırılıp:

TZP + trombin uygulanmış olan Grup 2’de nekroz oranlarının SF uygulanmış olan Grup 1’in nekroz oranlarından daha az olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,004$),

FY + trombin uygulanmış olan Grup 3’de nekroz oranlarının SF uygulanmış olan Grup 1’in nekroz oranlarından daha az olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,004$),

TZP + trombin uygulanmış olan Grup 2’de nekroz oranlarının FY + trombin uygulanmış olan Grup 3’ün nekroz oranlarından daha az olduğu ve bu farkın istatistiksel olarak anlamlı olduğu ($p=0,004$) görüldü.

DENEY II Sıçan no	GRUPLAR		
	1 (SF)	2 (TZP)	3 (FY)
1	28,7	19,5	25,0
2	27,8	18,7	24,6
3	29,3	19,9	25,4
4	30,1	21,1	23,6
5	28,5	18,0	26,1
6	29,5	19,2	23,8
Ort±SD	29,0±1,2	19,4±1,1	24,8±1,0

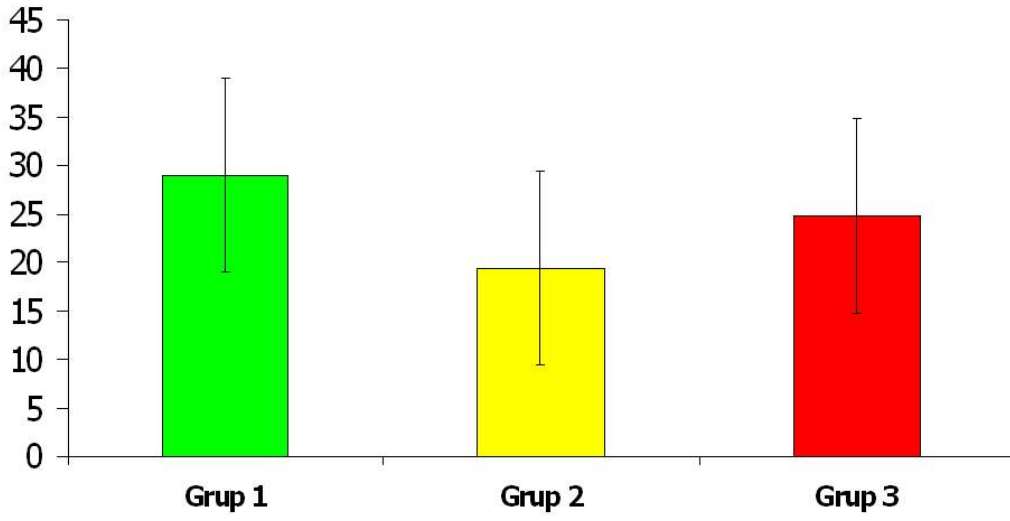
Tablo 4: 2. Deneyde, cerrahi işlemden 7 gün sonra fleplerin nekrozlu alanlarının toplam flep alanına göre yüzdeleri (%). Grup 1'e SF, Grup 2'ye TZP, Grup 3'e FY uygulanmıştır.

Gruplar kendi aralarında Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile kıyaslandığında:

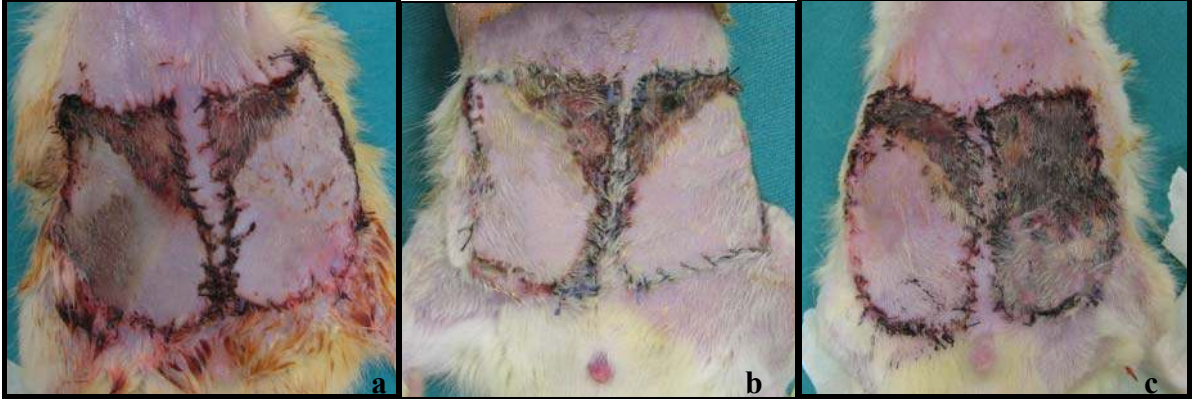
Grup 2'nin nekroz oranının Grup 1'den anlamlı şekilde az olduğu ($p=0,004$)

Grup 3'ün nekroz oranının Grup 1'den anlamlı şekilde az olduğu ($p=0,004$)

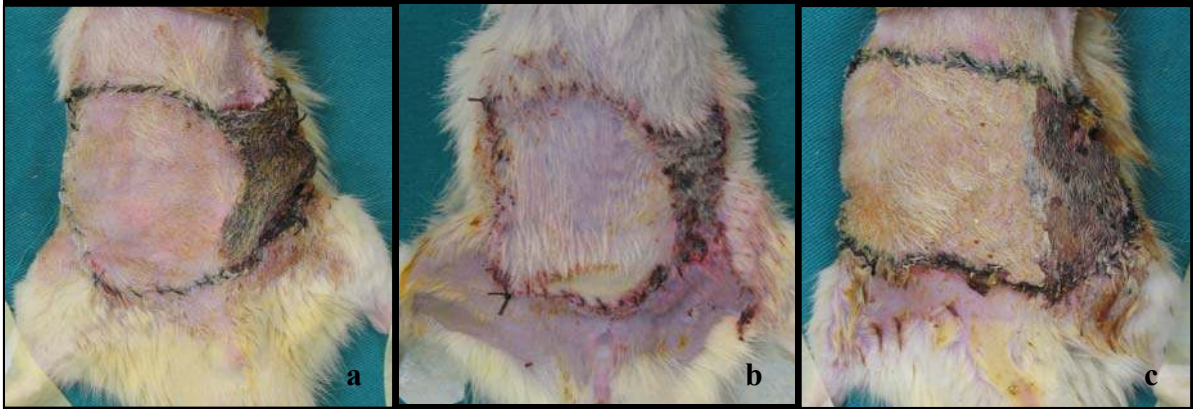
Grup 2'nin nekroz oranının Grup 3'ten anlamlı şekilde az olduğu ($p=0,004$) saptandı.



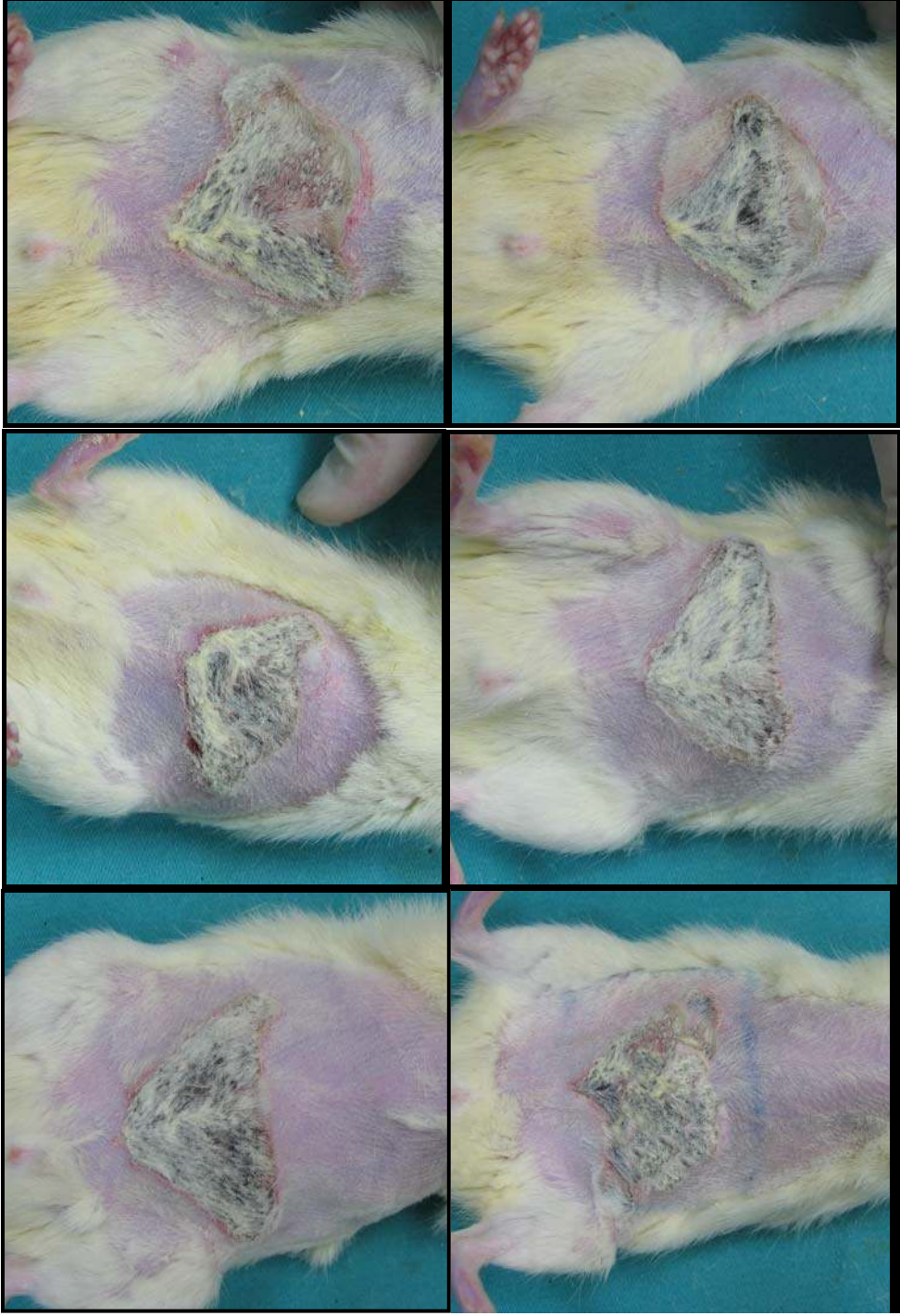
Şekil 22: Üstte, 2. Deneyde tüm gruplarda gelişen nekroz alanı yüzdelерinin dağılımı görölmektedir. Kruskal Wallis testi ile aralarında anlamlı fark olduğu saptanmış olan gruplardan her biri diğerleriyle Bonferroni düzeltilmeli Mann-Whitney U testi ile kıyaslanmış ve Grup 1 ve 2 arasında ($p=0,004$), Grup 2 ve 3 arasında ($p=0,004$), Grup 1 ve 3 arasında ($p=0,004$) istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır.

1.DENEY

Şekil 23: 1. Deneyde a: Grup I, b: Grup II, c: Grup III'teki nekroz oranları.

2. DENEY

Şekil 24. 2. Deneyde a: Grup 1, b: Grup 2, c: Grup 3'teki nekroz oranları.



Şekil 25: 2. Deney Grup 4'te cerrahi işlem öncesi yapılan trombin enjeksiyonlarını takiben gelişen nekrozlar.

D. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

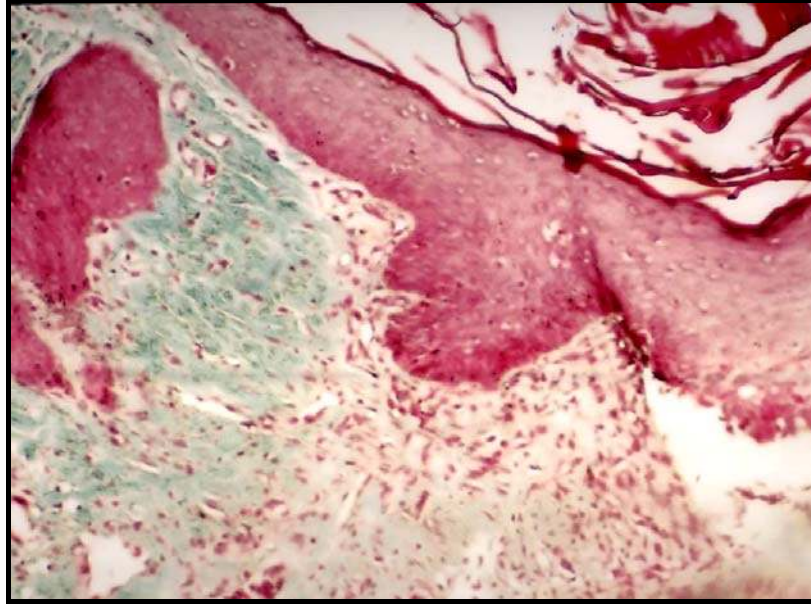
Her grupta, ameliyatın bitiminde normal ve flep kaldırılmış dokuların sınırından alınan biyopsi örnekleri Hematoksilen-Eozin ve Masson-Trikrom ile boyanarak değerlendirildi. Elde edilen histolojik bulgular kaydedilerek her gruba ve biyopsinin alındığı yere ait genel değişiklikler ortaya kondu. Alınan doku kesitleri, epidermis, dermis ve deri altı yağ dokusu içermekteydi.

1. Deneyde:

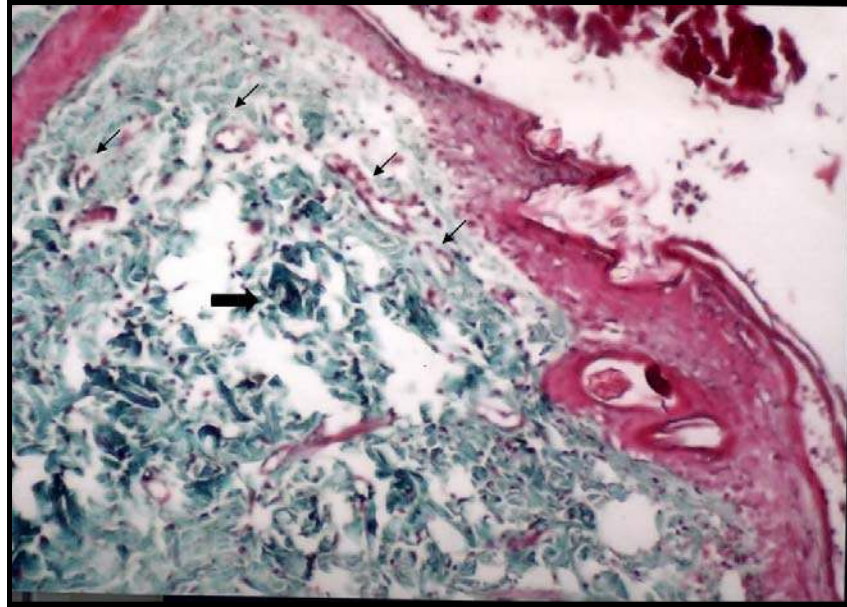
Grup I'in histolojik incelemelerinde sağdaki kontrol grubu tarafında epidermisten dermise devam eden inflamatuvar hücre infiltrasyonu gözlenirken (**Şekil 26**), solda altına TZP uygulanmış olan flepte reepitelizasyon, neovaskülarizasyon ve kollajen lif oluşumu saptandı (**Şekil 27**).

Grup II'nin sağdaki kontrol grubu tarafında da dermis ve epidermiste yaygın inflamatuvar hücre reaksiyonu görülürken, solda altına FY sıkılmış olan flepte yeni epitel oluşumu ve inflamatuvar hücre reaksiyonu saptandı, neovaskülarizasyona rastlanmadı (**Şekil 28**).

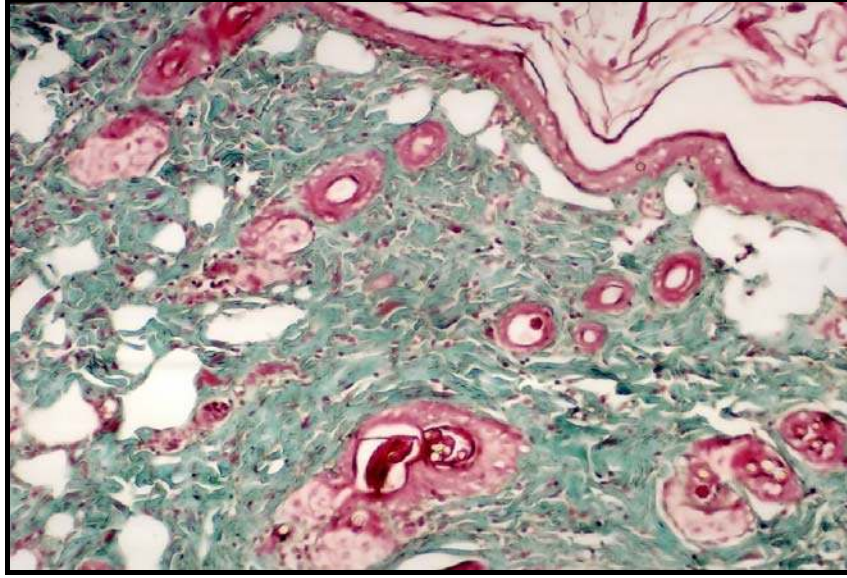
Grup III'ün hem sağdaki kontrol grubu tarafında hem de solundaki altına trombin sıkılmış olan flepte epidermiste bütünlük kaybı, artmış inflamatuvar hücre reaksiyonu saptandı, neovaskülarizasyon ve kollajen lif oluşumu görülmedi (**Şekil 29**).



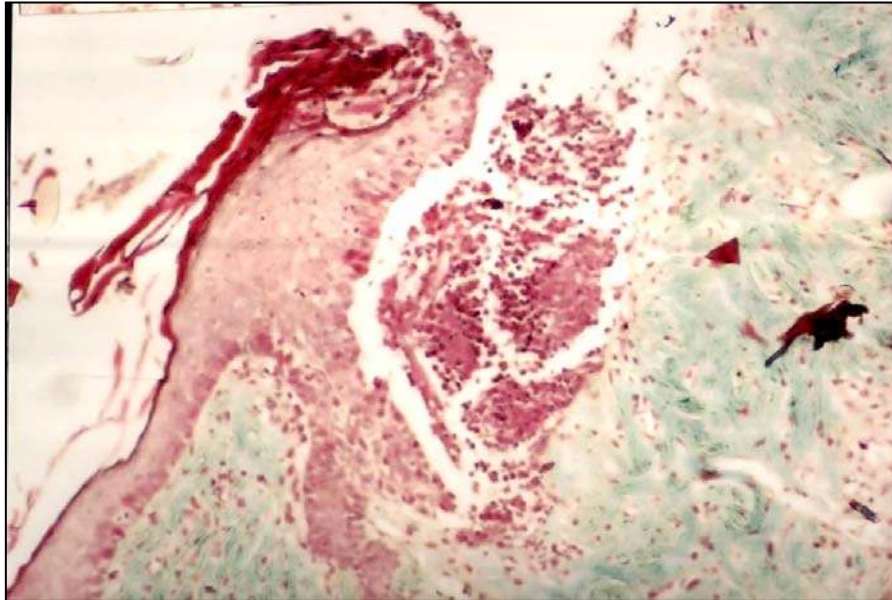
Şekil 26: 1. Deneyde Grup I'in sağdaki kontrol flebinde epidermisten dermise devam eden inflamatuvar hücre infiltrasyonu (Masson-Trikrom, X 100).



Şekil 27: 1. Deneyde Grup I'in soldaki, altına TZP + trombin uygulanmış flepte reepitelizasyon, neovaskülarizasyon ve kollajen lif oluşumu (ince oklar: neovaskülarizasyon, kalın ok: kollajen lifler) (Masson-Trikrom, X 100).



Şekil 28: 1. Deneyde Grup II'nin soldaki, altına FY + trombin uygulanmış flepte reepitelizasyon ve inflammatuar hücre infiltrasyonu (Masson-Trikrom, X 100).



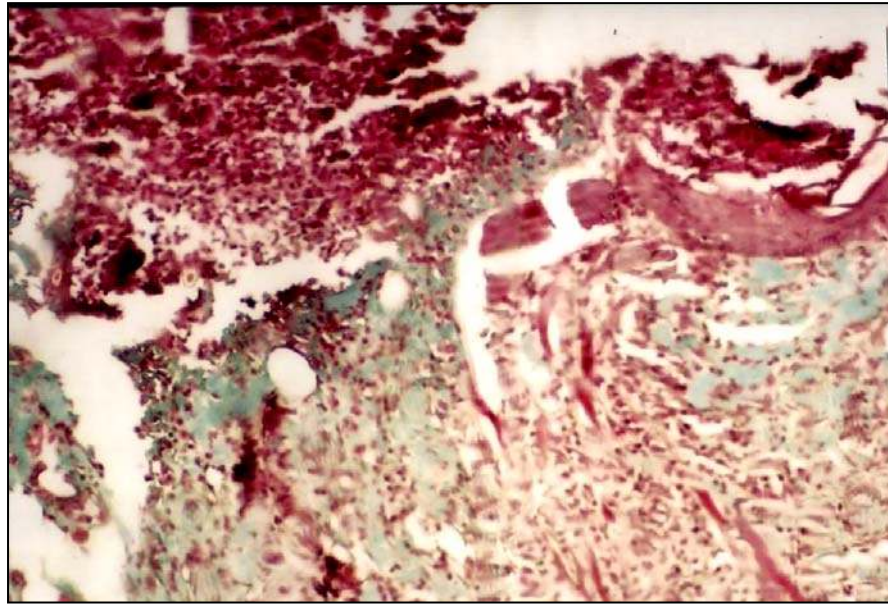
Şekil 29: 1. Deneyde Grup III'ün soldaki, altına trombin uygulanmış flepte inflammatuar hücre reaksiyonu (Masson-Trikrom, X 100).

2. Deneyde:

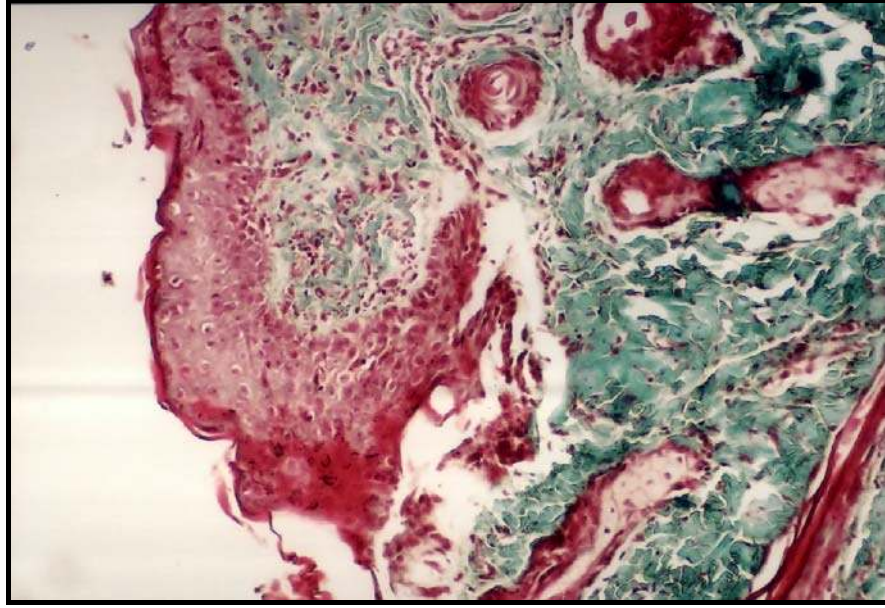
Flep kaldırılmasından 1 hafta önce flep sahasına SF infiltre edilmiş olan kontrol grubu Grup 1'in histolojik incelemelerinde epidermisten hipodermise uzanan bütünlük kaybı inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve artmış PMNL gözlemlendi (**Şekil 30**).

Flep kaldırılmasından 1 hafta önce flep sahasına TZP + trombin infiltre edilmiş olan Grup 2'nin histolojik incelemelerinde inflamatuvar hücre reaksiyonu, reepitelizasyon, ileri derecede neovaskülarizasyon ve kollajen oluşumu saptandı (**Şekil 31**).

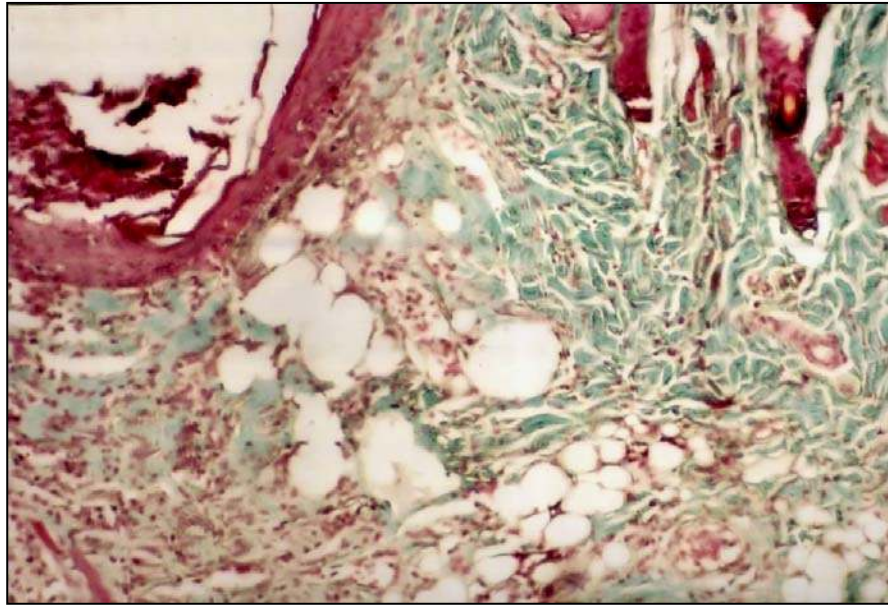
Flep kaldırılmasından 1 hafta önce flep sahasına FY + trombin infiltre edilmiş olan Grup 3'ün histolojik incelemelerinde epidermal bütünlük kaybı ve sınırlı inflamatuvar hücre reaksiyonu görüldü (**Şekil 32**).



Şekil 30: 2. Deneyde flep kaldırılmadan önce altına SF uygulanmış fleplerden oluşan Grup 1'de, epidermisten hipodermise uzanan bütünlük kaybı inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve artmış PMNL (Masson-Trikrom, X 100).



Şekil 31: 2. Deneyde flep kaldırılmadan önce altına TZP + trombin uygulanmış fleplerden oluşan Grup 2’de, inflamatuvar hücre reaksiyonu, reepitelizasyon, ileri derecede neovaskülarizasyon ve kollajen oluşumu (Masson-Trikrom, X 100).

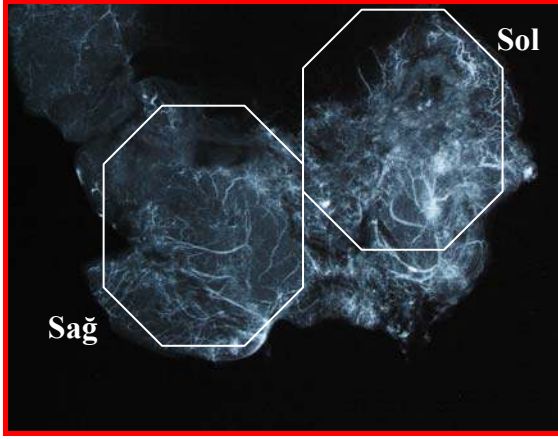


Şekil 32: 2. Deneyde flep kaldırılmadan önce altına FY + trombin uygulanmış fleplerden oluşan Grup 3’te, epidermal bütünlük kaybı, sınırlı inflamatuvar hücre reaksiyonu ve kollajen oluşumu (Masson-Trikrom, X 100).

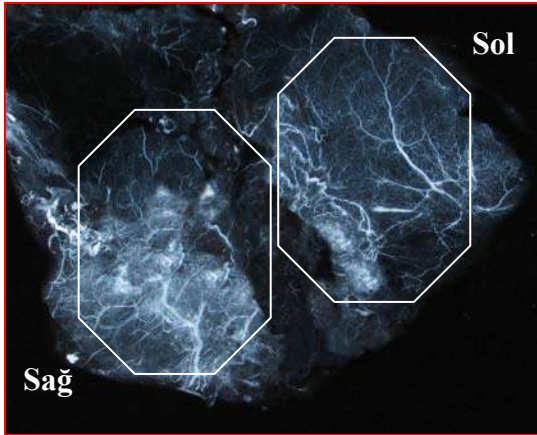
F. MİKROANJİOGRAFİK DEĞERLENDİRME BULGULARI

1. DENEY

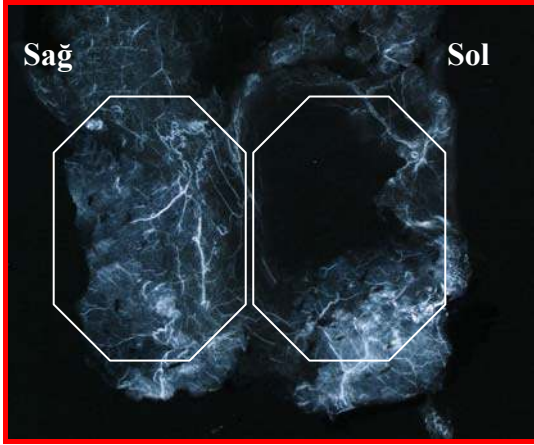
Subjektif değerlendirme sonrası daha kalın çaplı arter ve arteriollerin sayısı ve kalibrasyonlarında gruplar arasında belirgin bir fark bulunamadı. Ağ oluşturan kılcal damarların değerlendirmesinde Grup I' de soldaki damarlanmanın sağdakinden fazla ve damar çaplarının daha geniş olduğu dikkat çekiciydi (**Şekil 33**). Grup II'de de damarlanma artışı saptanmasına rağmen Grup I'deki sol flep damarlarındaki yoğunluğun Grup II'nin solundaki fleptekinden daha çok olduğu gözlemlendi (**Şekil 34**). Grup III'te altına trombin sıkılmış olan sol flep bölgesinde damarlanma azlığı saptandı (**Şekil 35**).



Şekil 33: Grup I' de soldaki damarlanmanın sağdakinden fazla ve damar çaplarının daha geniş olduğu dikkat çekiciydi (Sekizgenler flep alanlarını göstermekte).



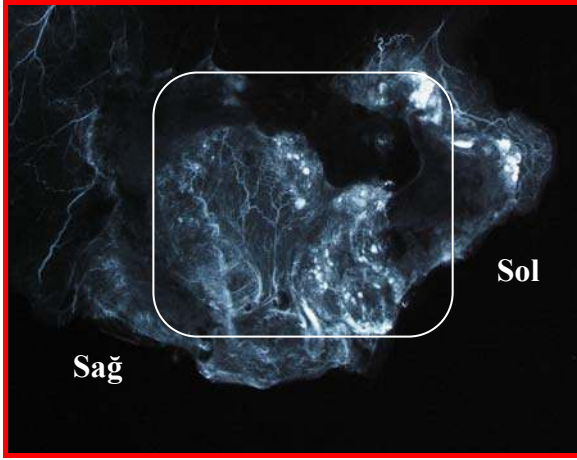
Şekil 34: Grup II' de de solda damarlanma artışı saptanmasına rağmen Grup I' deki sol flep damarlarındaki yoğunluğun Grup II' nin solundaki fleptekinden daha iyi olduğu gözlemlendi (Sekizgenler flep alanlarını göstermekte).



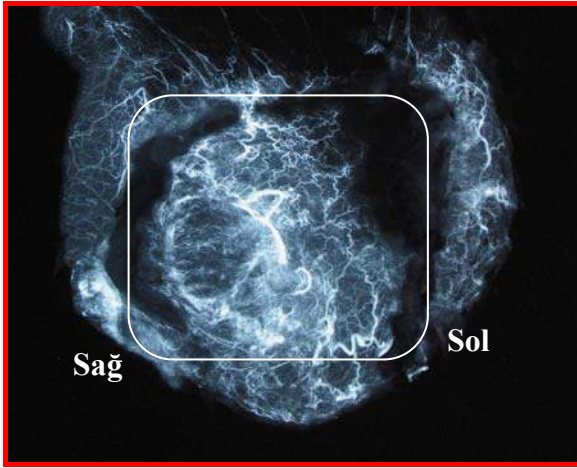
Şekil 35: Grup III'te altına trombin uygulanmış olan sol flep bölgesindeki damarlanma azlığı (Sekizgenler flep alanlarını göstermekte).

2. DENEY

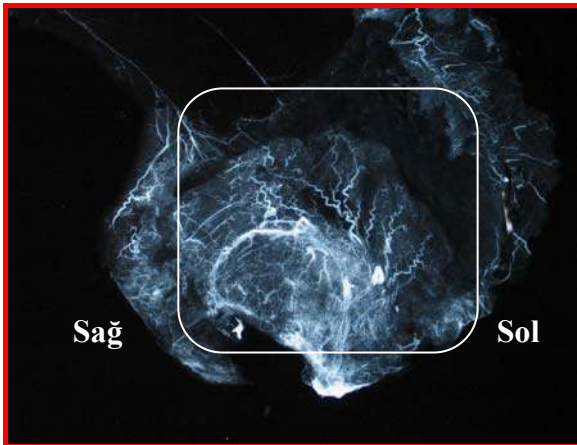
Subjektif değerlendirme sonrası daha kalın çaplı arter ve arteriollerin sayı ve kalibrasyonlarında gruplar arasında belirgin bir fark bulunamadı. Ağ oluşturan kılcal damarların değerlendirmesinde altına TZP sıkılmış olan Grup 2 (**Şekil 37**) ve altına FY sıkılmış olan Grup 3'te (**Şekil 38**) altına SF sıkılmış Grup 1'de (**Şekil 36**) görülenden daha fazla damarlanma ve damarlarda çap artışı saptandı.



Şekil 36: Altına SF uygulanmış olan Grup 1'in mikroanjiyografisi (Dörtgenler flep alanlarını göstermekte).



Şekil 37: Altına TZP uygulanmış olan Grup 2'de altına SF uygulanmış olan Grup 1'de görülenden daha fazla damarlanma ve damarlarda çap artışı saptandı (Dörtgenler flep alanlarını göstermekte).



Şekil 38: Altına FY uygulanmış olan Grup 3'te altına SF uygulanmış olan Grup 1'de görülenden daha fazla damarlanma ve damarlarda çap artışı saptandı; fakat bu artış Grup 2'de görülenden daha azdı (Dörtgenler flep alanlarını göstermekte).

V. TARTIŞMA ve SONUÇ

Deri fleplerinde gelişen parsiyel ve beklenmedik nekrozlar halen plastik cerrahinin önemli bir problemi olmaya devam etmektedir. Tagliacozzi'nin 16. yy da mekanizmasını tam olarak anlamadan yaptığı ilk geciktirme işlemlerinin üzerinden 400 yıldan fazla süre geçmiş olmasına rağmen patofizyolojisi tam olarak açıklanamamış, fakat günümüzde hem serbest flep uygulanması mümkün olmadığına pediküllü fleplerin yaşayabilirliğini arttırmak için, hem de serbest flepler de dahil herhangi bir fleple onarım söz konusu olduğunda komşu damarlanma bölgelerini flebe dahil ederek flep boyutlarını arttırabilmek için ilk tercih edilen işlem olma özelliğini korumaktadır.¹⁹ Klinik uygulamalarda geciktirmenin amacı Angel ve arkadaşları tarafından bilinmeyen bir flebi yaşayabilir hale getirmek, bilinen bir flebin dolaşımını arttırarak yaşayabilirlik sınırını genişletmek olarak belirtilmiştir.⁹ Bu fenomenin başlatıcısının “subletal iskemi” olduğu düşünülmekte ve etkin olabilecek diğer mekanizmalar “A-V shunt” ların kapanması, dokuların hipoksiye alışması, daha önceden varolan damarların vazodilatasyonu sonucu flebe giden kan akımının artması şeklinde özetlenmektedir. Bu hipotezler “A-V shunt” ların kapanmasına neden olan ve dolaşımda bulunan katekolaminlere, flebin ilerleyici iskemi ve inflamasyonuna neden olan arakidonik asit metabolitlerine, vazodilatasyonla sonuçlanan sempatektomi ve denervasyon hipersensitivitesine dayandırılmış, fakat metabolik değişiklikleri yöneten faktörler aydınlatılamamıştır.^{79,93,123}

Pediküllü fleplerde pedikül ayırma zamanının 10-14 gün civarında tutulduğu bilinmekle birlikte hastanede kalış süresinin kısaltılıp maliyetin azaltılması ve hastanın en kısa sürede günlük hayatına ve işine dönebilmesinin sağlanması açısından pedikül bağlama zamanının, flep güvenilirliği korunarak kısaltılması da temel hedeflerden olmuştur. Bu hedefin sağlanabilmesi flep fizyolojisini ilgilendirdiği için yapılan çalışmalar, flep

fizyolojisini ilgilendiren bir diğer olay olan geciktirme fenomenine yönelik yapılan çalışmalar ile örtüşmektedir.

Geciktirme sırasında flepteki arteriyel akımda değişiklikler olduğu hem histolojik hem de mikroküre perfüzyon tekniği ile yapılan çalışmalarla gösterilmiştir.^{19,64,72,80,123,124,131,137,145} Geciktirilmiş fleplerde, vazokonstriksiyonla başlayıp sonra vazodilatasyon ve damar duvar hücrelerinde hipertrofi ve hiperplazi ile devam eden damarsal yapı değişiklikleri görülmektedir. Flep boyunca gelişen damarsal reoryantasyona anjiozomlar arasındaki “choke” damar dilatasyonu sonucu komşu anjiozomlarla bağlantı artışı eşlik etmektedir.^{35,38,68,148,149} Fakat hala en önemli sorun damar dilatasyonuna neden olan faktörün veya faktörlerin ne olduğudur. Katkısı olduğu düşünülen faktörler kan basıncının “fiziksel germe” etkisi ve hipoksi olarak düşünülmektedir.⁹ Hipoksi aynı zamanda neovaskülarizasyon için oldukça önemli bir uyarıcı olup geciktirmenin mekanizmasını neovaskülarizasyona dayandıran araştırmacılar da olmuştur.^{54,72,94,139} Ancak, hipoksinin yeni damar oluşumunu başlatma mekanizması da açıklığa kavuşturulmayı beklemektedir.

Klinikte pediküllü olan ya da olmayan tüm flep rekonstrüksiyonlarında ana hedefler hastanede kalış zamanını ve maliyeti minimuma indirerek flep yaşayabilirliğini ve hasta konforunu arttırmak, pediküllü fleplerde pedikül ayırma zamanını sağkalım oranını azaltmadan kısaltabilmek olmuştur. Bu amaçlar doğrultusunda, geciktirme etkisini ikinci bir ameliyatın risk ve masrafları olmaksızın, muhtemel mekanizmaları taklit ederek, daha basit şekilde sağlayacak farmakolojik ajanlar araştırılmış, fakat optimum bir madde henüz bulunamamıştır.^{2,3,28,43,77,93,111}

Anjiyogenez, yeni kapiller oluşumu için endotel hücrelerinin harekete geçmesi, göç etmesi ve çoğalmasını gerektiren, normal şartlarda erişkinlerde nadir gözlenmesine rağmen

tümör oluşumu, romatoid artrit ve diyabetik retinopati gibi patolojik durumlarda kontrolsüz olarak işleyen biyolojik bir mekanizmadır. Yakın zamanda araştırmacılar bazı büyüme faktörlerinin doğrudan veya dolaylı olarak anjiyogenezi uyardığını saptamışlardır.^{13,29,37,50,83,134} Büyüme faktörleri, kendilerine özgü hücrelerin biyolojik aktiviteleri üzerinde reseptörler yoluyla etkilerini gösteren, küçük proteinler veya glikoproteinlerin oluşturduğu sitokinlerdir. Tek başlarına etki gösterebildikleri gibi, bazılarının sinerjistik etkileşimleri olduğu da anlaşılmıştır. Bu büyüme faktörleri arasında, “basic fibroblast growth factor” (bFGF), “platelet-derived growth factor” (PDGF), “transforming growth factor- β ” (TGF- β) ve “vascular endothelial growth factor” (VEGF) en iyi bilinen ve üzerinde en çok çalışılanlardır. Bunlar arasında VEGF en güçlü anjiyojenik etki gösterendir ve hipoksinin VEGF salınımını uyardığı saptanmıştır.^{120,66}

Anjiogeneiz, yara ve kemik iyileşmesi üzerindeki etkilerinin gösterilmesinden sonra büyüme faktörleri pek çok çalışmada kullanılmış ve iskemik deri fleplerinin yaşayabilirliğini arttırdıkları gösterilmiştir.^{93,116,167,168,169,171} Kimi araştırmacılar neovaskülarizasyonun flep yaşayabilirliği üzerinde etkisi olmadığını iddia etseler de Brown çalışmasında anjiogenezi uyaran bir protein olan PDGF’ü kullanarak flep kanlanmasını artırıp pedikül ayırma zamanının kısaltılabileceğini önermiş ve yine başka araştırmacılar tarafından anjiyojenik moleküller olan PDGF, VEGF, bFGF, TGF- β , vb. kullanılarak flep yaşayabilirliklerinin arttığı kanıtlanmıştır.^{21,71,82,93,129,167,168,169,171} Büyüme faktörlerinin adenovirüsler yoluyla iskemik dokulara transfeksiyonu hayvan deneylerinde olumlu sonuçlar vermekte ve klinikte iskemik fleplerin tedavisinde gelecek için ümit vaat etmektedir.^{29,66,71} Dışarıdan verilen maddelerle iskemik dokulara doğru olan yeni damar oluşumunun artırılmasının mümkün

olduğu gösterildikten sonra bu konuya olan ilgi artmış ve “terapötik anjiogenez” kavramı geliştirilmiştir.^{29,37,48,49,50,71,97,120,133,147}

Trombosit kaynaklı büyüme faktörü (PDGF): Önce fibroblast ve düz kas hücrelerine mitojen olduğu ve yara iyileşmesinin erken fazlarında ortamda bulunduğu anlaşılmıştır.⁶⁹ Kendisi dışında diğer büyüme faktörlerinin de salınımını uyarır ve bazılarıyla sinerjistik etki gösterir.^{61,89,158,141} Yara iyileşmesi üzerindeki etkileri, iyileşmede rol alan nötrofil, monosit, makrofaj ve fibroblastların çoğalmasını sağlamasına, anjiogenez, kollajen, fibronektin, hyaluronik asit üretimini, diğer büyüme faktörleri ve hücrelerin fonksiyonlarını arttırmasına bağlanmıştır.^{10,20,61,62,69,85,86,89,128,142} Kemik, periodontium, tendon, sinir iyileşmesini olumlu etkilediği, cerrahi yaralarda gerim gücünü arttırdığı, kronik yaralarda iyileşmeyi hızlandırdığı, iskemik fleplerde flep sağkalımını arttırdığı gösterilmiştir.^{7,20,26,53,61,69,89,121,141,143,172}

Transforming büyüme faktörü (TGF-β): Tek başına yarattığı etkiler yanında PDGF ile sinerjistik etkileri de olan TGF-β hücre döngüsü regülasyonu, extraselüler matriks üretimi, anjiogenezin uyarılması sayesinde yara iyileşmesi ve farklılaşmasını sağlayan kemotaktik bir moleküldür. Yara iyileşmesi dışında tendon, ligaman, kemik ve sinir iyileşmesine olumlu katkıları bildirilmiştir. Huemer ve McGee flep yaşayabilirliğini de arttırdığını saptamışlardır.^{7,71,89,120}

Bazik fibroblast büyüme faktörü (bFGF): İlk kez fibroblastlar üzerindeki mitojenik etkisi gösterilmiş olan bu molekülün endotel hücreleri, osteoblastlar, kondrositler, Schwann hücreleri ve keratinositler üzerinde de mitozu arttırıcı etkisi vardır. Tek başına anjiogenezi uyaramadığı gibi VEGF ve TNF-α ile birlikte olduğunda maksimum anjiogenik etkisini

gösterir. Kollajenaz enzim salınımı ve kapiller endotelyal hücre proliferasyonunu arttırarak anjiogenezi başlatır.^{33,83,109,120,133} Yara iyileşmesinde özellikle keratinositlerin proliferasyon ve göçüne neden olarak etki gösterdiği saptanmıştır. Rashid ve arkadaşları bFGF'ü sukralfat ile kombine ederek, Khouri tek başına ve Uhl rekombinant formunu tek başına flep sağkalımına etkilerini araştırmak için kullanmış ve başarılı sonuçlar bildirmişlerdir.^{66,82,129,168}

Vasküler endotelyal büyüme faktörü (VEGF): Hem normal hem de patolojik anjiogenez sürecinin en potent uyarıcısı olup vasküler bazal membranların yıkılması için gerekli olan kollajenaz ve jelatinazın indüksiyonuna, daha sonra α integrinlerin ekspresyonuna neden olarak iyileşen dokuda anjiogenezi başlatır.^{25,33,66,83,120,127,147} Vasküler geçirgenliği arttırmasının yanında, en çok endotel hücreleri üzerinde olmak üzere fibroblast, ve inflamatuvar hücreler üzerinde mitojenik etkileri vardır.^{17,29,37,51,70,83,167,168,169} Yara, tendon, sinir iyileşmesi üzerinde etkisinin olduğu gösterilmiştir.^{26,92,127} Ayrıca Zhang, Banbury, Kryger ve Padubidri gibi araştırmacılar yaptıkları kas ve/veya deri fleplerinde flep sağkalımında artış saptamışlardır. İskemik ekstremitelere uygulandığında damarlanma artışı olduğu da gösterilmiştir.^{69,93,133,147,167,168,169,170,171}

İnsülin benzeri büyüme faktörü-I (IGF-I): Fibroblast, keratinosit, osteoblast, epitel hücreleri, nöronlar vb pek çok hücre grubu üzerinde mitojenik etkisi olduğu bilinen IGF-I protein sentezi, periferik glukoz alımı, glikojen sentezi, sinir sağkalımı, miyelin sentezi, kemik oluşumu gibi anabolik etkileri arttırır, kaslardaki protein yıkımı gibi katabolik etkileri azaltır. Trombosit kaynaklı büyüme faktörü ile birlikte olduğunda daha etkin olduğu; tendon, kıkırdak ve yara iyileşmesinde olumlu etkileri rapor edilmiştir.^{10,29,37,69,70,138,151}

Epidermal büyüme faktörü (EGF): Fibronektin gibi proteinlerin üretimini ve epitel hücre göçünü uyararak yara iyileşmesinin erken safhalarında rol alan EGF yaralara uygulandığında epitelizasyon ve gerim kuvvetinin arttığı saptanmıştır.^{23,33,83}

Trombosit zengin plazma birbirini takip eden iki santrifüj işlemi sonrası trombositlerin yoğunlaştırılması ile elde edilen bir madde olup içerdiği alfa granüllerindeki büyüme faktörlerinin salınımı trombin ve kalsiyum ile aktive edilmelerine bağlıdır. Teknolojik ilerlemeler sayesinde özel sistemlerle yatak başı hazırlanabildiği gibi bizim çalışmamızda kullandığımız kan bankası santrifüj sistemiyle de hazırlanabilir ve trombositler 3-8 katına kadar konsantre edilebilirler.^{7,12,27,101,165} Trombosit zengin plazma gibi fibrin yapıştırıcı da kanın santrifüj edilip plazma kısmının ayrılmasıyla elde edilen bir madde olup, uygulanması iki sistemden oluşan mekanizmayla gerçekleşir. Bu sistemin ilk kısmında fibrinojen, soğuk çözünmeyen globulin, plazma proteinleri ve faktör XIII, diğer kısmında trombin ve kalsiyum klorid vardır. İki sistem karıştığında trombin sayesinde fibrinojen fibrine dönüşüp katılır ve pıhtılaşma olayı başlar.⁸ Uygulandığı bölgelerde hemostazın sağlanmasına yardımcı olur. Fibrin yapıştırıcının TZP'den farkı fibrinojen oranının FY'da yüksek olması ve büyüme faktörlerini çok miktarda içeren alfa granüllere sahip olan trombositleri içermemesidir. Fibrin yapıştırıcı uygulamalarında genellikle otolog olmayan hazır ürünler kullanıldığı için hastalık transmisyon riski mevcuttur ve bu olasılık kullanımını kısıtlamaktadır.^{8,33} Yukarıda özetlendiği gibi büyüme faktörleri hem tek başlarına hem de kombine edilerek kullanıldıklarında yara, kemik, sinir, tendon, ligament iyileşmesi ve flep yaşayabilirliği üzerine olumlu etkileri saptanmıştır. Muhtemelen değişik mekanizmalar üzerinden birbirleriyle etkileşen bu sitokinlerin ikiden fazlası bir arada verildiğinde (TZP'de olduğu gibi) daha olumlu sinerjistik etkileri saptanabilecektir.

Bu çalışmada da içerisinde çok sayıda büyüme faktörü olduğu bilinen TZP'nin pediküllü bir flepte pedikül ayırma zamanının kısalmasına yardımcı olma ihtimali ve flep sağkalımını olumlu etkilemesi durumunda farmakolojik olarak geciktirme işlemi yapılmasını sağlama olasılığı araştırıldı.

Bu deneysel çalışmada flep modeli olarak sıçan karın ve kasık flepleri tercih edildi. Bunlar hem flep sağkalımının değerlendirilmesinde hem de geciktirme fenomeninin çalışılmasında oldukça iyi bilinen modellerdir.¹⁵ Ayrıca, flebin normalden büyük tasarlanması ve bir taraftaki epigastrik damarların kesilmesi, flepte nekroz alanını değerlendirmemizi sağlayacak bir random bölge oluşturmaktadır.⁴ Bu flepte ister intravenöz ister flep altına uygulanacak bir kimyasal maddenin etkilerini araştırmak ve bilateral dizayn edilebileceği için aynı hayvan üzerinde kontrol grubunu da oluşturmak mümkün olmaktadır.

Flep yaşayabilirliğini değerlendirme yöntemlerinden en çok kullanılanlarından birisi nekroz alanlarının yüzde olarak hesaplanmasıdır. Birinci deneyde, tüm grupların (Grup I, Grup II, Grup III) karın sağ yarımalarında hazırlanan flepler (kasık flepleri) soldakilerin kontrol grubu olarak kaldırılıp ek işlem uygulanmaksızın yerine iade edilmiştir. Hem TZP + trombin (Grup II), hem de FY + trombin uygulanan grupta (Grup III), aynı sıçan üzerinde bulunan kontrol gruplarına göre flep nekroz oranlarının azaldığı ($p=0,012$), flebin altına sadece trombin uygulanmış olan Grup III' te flep nekroz oranlarının aynı sıçan üzerindeki kontrol fleplerine ($p=0,012$) ve diğer grupların soldaki fleplerine kıyasla ($p<0,0001$) belirgin olarak arttığı görülmüştür. Fibrin yapıştırıcı ve TZP uygulanmış fleplerin nekroz oranları Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi ile kıyaslandığında FY grubunda nekroz oranlarının istatistiksel olarak anlamlı derecede fazla olduğu saptanmıştır. ($p<0,001$)

Birinci deneyde flep altına uygulanan hem FY hem de TZP'nin flep sağkalımını arttırdığı, ayrıca TZP etkisinin FY'dan daha çok olduğu gösterilmiştir. Bu sonuçlar flep kaldırıldıktan sonra TZP uygulamasının pedikül ayırma zamanını öne çekmemizi sağlayacağını göstermiştir. Flep altına trombin sıkılan grupta nekroz oranlarının bariz şekilde artması, yüksek konsantrasyonda trombin (1000 IU/ml) ile trombojenik etkinin arttığının gösterildiği çalışmalarla paralellik göstermektedir.^{41,52} Mikrovasküler anastomozların üzerine değişik konsantrasyonlarda trombin içeren fibrin yapıştırıcılar uygulayan Marek de yüksek konsantrasyonda trombin içeren fibrin yapıştırıcı uyguladığında fleplerin çoğunda (%70) nekroz gözlemlemiştir.⁹⁹ Bu araştırmacıların trombinin güvenle kullanılabilecek alt sınırını 500 IU/ml olarak söylemelerine rağmen, bizim çalışmamızda 100 IU/ml'nin bile flepte nekroz artışına yol açtığı görülmüştür.

İkinci deneyde, sıçanların karın flebi kaldırılması planlanan bölgelerinde pannikulus karnozus dokusu altına Grup 1'de SF, Grup 2'de TZP + trombin, Grup 3'te FY + trombin, Grup 4'te sadece trombin sıkılmış ve 1 hafta sonra karın flebinin sağ süperfisiyal epigastrik damarlar üzerinde kaldırılması planlanmıştır. İlk üç grupta 1 hafta sonunda flepler kaldırılabilirken son grupta karın bölgeleri nekroza gittiği için flep kaldırılamamıştır. Bu nekroz 100 IU/ml trombin enjeksiyonu sonrası kaydedilmiş olup 1. deneydeki sonucumuzla paralellik göstermektedir. Diğer üç grup cerrahi işleminden bir hafta sonra kendi aralarında değerlendirildiğinde kontrol grubu olan Grup 1'de nekroz yüzdelerinin diğerlerinden anlamlı şekilde fazla olduğu ($p=0,004$), TZP kullanılmış olan Grup 2'nin de nekroz yüzdelerinin diğer iki gruptan anlamlı şekilde az olduğu ($p=0,004$) saptanmıştır. Bu sonuçlarla kimyasal geciktirme fenomeninden faydalananak FY ve TZP uygulamasıyla flep yaşayabilirliğini arttırdığımızı, bu artışın TZP'de daha çok olduğunu gösterdik. Trombin uygulanan karın

bölgelerinde görülen nekrozların 1. deneyde de artmış nekroz yüzdesiyle kendini göstermesi ayrı bir önem taşımaktadır.

Değerlendirme yöntemlerinden bir diğeri olan histolojik incelemede her iki deneyde de TZP uygulanmış fleplerden yapılan örneklemelerde reepitelizasyon, *neovaskülarizasyon* ve kollajen lif oluşumu; FY sıkılmış olan fleplerde reepitelizasyon ve inflamatuvar hücre infiltrasyonu; kontrol gruplarında ise sadece inflamatuvar hücre reaksiyonu gözlenmiştir. Mikroanjiyografik incelemede de TZP uygulanan fleplerde *ince damarlarda artış* gözlemlenmesi histoloji bulgularını destekler niteliktedir.

Bu deneysel çalışmada, farmakolojik geciktirme fenomeninden faydalanarak sıçan epigastrik fleplerinin yaşayabilirliğinin arttığı gösterilmiştir. Bu duruma TZP içindeki büyüme faktörlerinin arttırdığı anjiogenezin etken olması mümkündür. Geciktirmede hipoksinin neovaskülarizasyona neden olduğu bilinmektedir ve neovaskülarizasyonu TZP'nin farmakolojik olarak sağlayabileceği düşüncesi çalışmamız sayesinde desteklenmiştir.

Bu sonuçlara dayanarak, TZP'nin klinikte random ve pediküllü fleplerin başarı oranlarının arttırılması, büyük doku defektlerinin rekonstrüksiyonunda flep boyutunun arttırılması, prefabrike fleplerde veya flep geciktirmesinde hem flep boyutlarının arttırılması hem de bekleme süresinin kısaltılması amacı ile ve ayrıca anjiyogenezi uyatarak kronik deri ülserlerinin tedavisinde kullanılabilecek otolog bir madde olduğu söylenebilir. Daha çok dış hekimleri tarafından klinikte kullanılmaya başlanan TZP daha sonra ortopedistler ve oküler cerrahlar tarafından da kullanılmaya başlanmış, son yıllarda Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi literatüründe de yer bulmuştur. TZP'nin tek veya tekrarlayan uygulama yöntemleriyle yeni çalışmaların yapılması klinik kullanım alanının genişlemesine ve uygulamalarının yaygınlaşmasına neden olabilecektir.

VI. ÖZET

Geciktirme etkisini farmakolojik olarak sağlayabilecek bir madde arayışı sürmektedir. Anjiojenik büyüme faktörlerini içeren trombosit zengin plazmanın, pedikül ayırma zamanını erkene çekebilme ve geciktirme etkisi sağlayabilme potansiyelini araştırmak amacıyla iki çalışma tasarlanmıştır.

Birinci deneyde bilateral kasık flebi oluşturulan 24 sıçan 3 gruba ayrıldı. Her sıçanın sağdaki flepleri karşı tarafa kontrol grubu olurken soldakilerden Grup I'dekilerin (n=8) altına trombosit zengin plazma, Grup II'dekilerin (n=8) altına fibrin yapıştırıcı, Grup III'tekilerin (n=8) altına trombin uygulandı. Bir hafta sonra tüm fleplerin pedikülleri bağlanıp işlemiden bir hafta sonra flep nekroz yüzdeleri hesaplandı. İkinci deneyde karın flep modeli oluşturulan 24 sıçan 4 gruba ayrıldı. Flep kaldırılması planlanan bölgenin altına Grup 1'de serum fizyolojik, Grup 2'de trombosit zengin plazma, Grup 3'te fibrin yapıştırıcı, Grup 4'te trombin enjekte edildi. Bir hafta sonra ilk üç grupta sağ inferior epigastrik damarlar üzerinde flepler kaldırılabilirken Grup 4'te flep kaldırılması planlanan bölgeler nekroza gittiği için işlem gerçekleştirilemedi. Grup 1, 2, ve 3'te cerrahiden bir hafta sonra nekroz yüzdeleri hesaplandı. İki deneyde de her gruptan iki sıçan mikroanjiyografik olarak incelenirken tümünün histolojik değerlendirmeleri yapıldı.

Trombosit zengin plazmanın iki deneyde de fibrin yapıştırıcı, trombin ve kontrol gruplarına göre nekroz miktarını azalttığı saptandı ($p<0,05$). Trombosit zengin plazma uygulanan gruplarda histolojik ve mikroanjiyografik olarak küçük çaplı arterlerde artış gözlemlendi. Birinci deneyde trombin uygulandığında görülen artmış nekroz yüzdeleri ikinci deneyde trombin uygulaması sonrası gelişen nekrozlarla paralellik göstermekteydi.

Bu alışma, trombosit zengin plazmanın pedikül ayırma zamanını erkene çekebileceğini, farmakolojik olarak geciktirme etkisi sağlayabileceğini ve muhtemel mekanizmanın neovaskülarizasyon olduğunu, trombinin ise flep sağkalımını olumsuz etkileyen bir madde olduğunu ortaya koymaktadır.

VII. SUMMARY

Two experimental models were designed to study effects of platelet rich plasma on shortening pedicle ligation time and achieving delay phenomenon pharmacologically.

In the first study bilateral epigastric flaps were elevated in 24 rats. Right-sided flaps were control flaps of the left side. In Group I (n=8) platelet rich plasma, in Group II (n=8) fibrin glue (FG) and in Group III (n=8) thrombin had been applied to the flap site. One week later all flap pedicles were ligated. In the second study right unipedicled epigastric flaps were elevated in 24 rats. One week before flap elevation saline solution had been applied under the flap area in Group 1 (n=6). Same procedure was performed with platelet rich plasma in Group 2 (n=6), fibrin glue in Group 3 (n=6), thrombin in Group 4 (n=6) instead of saline. One week later flaps were elevated in first three groups. In Group 4 as abdominal area had undergone necrosis, flap elevation couldn't have been achieved. Flap necrosis was measured on the seventh day. While two rats from each group were examined microangiographically, histological evaluation was performed on tissue samples of all rats.

PRP reduced amount of necrosis in both studies when compared to fibrin glue, thrombin and control groups. Histologically and microangiographically increased number of arterioles were observed in platelet rich plasma applied groups. Increased necrosis in the first study's thrombin applied group showed concordance with the second study's necrosis results that occurred after thrombin application.

This study demonstrates that platelet rich plasma might shorten pedicle division time, and provide delay effect pharmacologically. As thrombin increases necrosis, it is not suitable in flap surgery when used alone.

VIII. KAYNAKLAR

1. Aarts HF: Regional intravascular sympathetic blockade for beter results in flap surgery: An experimental study of free flaps, island flaps, and pedicle flaps in the rabbit ear. *Plast Reconstr Surg* 66(5): 690-698, 1980
2. Acikel C, Kenkel JM, Nojima K, Hoopman JE, Saboorian MH, Brown SA: Nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flap using a long-pulsed 1064-nm Nd:YAG Laser with a contact cooling device. *Plast Reconstr Surg* 116(5): 1411-1420, 2005
3. Acikel C, Kenkel JM, Ozturk S, Nojima K, Hoopman JE, Gokaslan ST, Brown SA: Evaluation of Flashlamp-pumped pulsed-dye laser (585nm) in nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 115(7): 2032-2041, 2005
4. Adanalı G, Seyhan T, Turegun M, Senen D, Sensoz O: Effects of different vascular patterns and the delay phenomenon on rat ventral island flap viability. *Ann Plast Surg* 48(6): 660-664, 2002
5. Aghaloo TL, Moy PK, Freymiller EG: Investigation of Platelet-rich plasma in rabbit cranial defects: A pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 60: 1176-1181, 2002
6. Akyurek M, Ozkan O, Safak T, Ozgentas HE, Dunn RM: The penile flap in the rat: Description and autotransplantation. *Ann Plast Surg* 55(1): 94-100, 2005
7. Altmeppen J, Hansen E, Bonnländer GL, Horch RE, Jeschke MG: Composition and characteristics of an autologous thrombocyte gel. *J Surg Res* 117: 202-207, 2004
8. Anderson KW, Baker SR: Advances in facial rejuvenation surgery. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11:256-260, 2003

9. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: Evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plast Reconstr Surg* 81: 233-239, 1988
10. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT: Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91: 4-15, 2004
11. Aspenberg P, Virchenko O: Platelet concentrate injection improves Achilles tendon repair in rats. *Acta Orthop Scand* 75(1): 93-99, 2004
12. Babbush CA, Kevy SV, Jacobson MS: An in vitro and in vivo evaluation of autologous platelet concentrate in oral reconstruction. *Implant Dent* 12: 24-34, 2003
13. Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Browne E: Improved perfusion after subcritical ischemia in muscle flaps treated with vascular endothelial growth factor. *Plast Reconstr Surg* 106: 1541-1546, 2000
14. Banoth S, Alex JC: Current applications of platelet-gels in facial plastic surgery. *Facial Plast Surg* 18:27-32, 2002
15. Bayramiçli M: Deneysel flep modelleri: Deri flepleri. In: In: Deneysel Mikrocerrahi, Editor: Bayramiçli M, Argos, Istanbul 2005, 443-489
16. Bayramiçli M, Yılmaz B, Numanoğlu A: Modified protective rat vest. *Plast Reconstr Surg* 101: 859-860, 1998
17. Becker JC, Beckbauer M, Domschke W, Herbst H, Pohle T: Fibrin glue, healing of gastric mucosal injury and expression of growth factors: results from a human in vivo study. *Gastrointest Endosc* 61(4): 560-566, 2005

18. Becker JC, Domschke W, Pohle T: Biological in vitro effects of fibrin glue: fibroblast proliferation, expression and binding of growth factors. *Scand J Gastroenterol* 10: 927-932, 2004
19. Boyd JB, Markland B, Dorion D, Pang CY, Morris S: Surgical augmentation of skin blood flow and viability in a pig musculocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg* 86(4): 731-738, 1990
20. Brissett AE, Hom DB: The effects of tissue sealants, platelet gels, and growth factors on wound healing. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg* 11: 245-250, 2003
21. Brown DM, Hong SP, Farrell CL, Pierce GF, Khouri RK: Platelet-derived Growth Factor-BB induces functional vascular anastomoses in vivo. *Proc Natl Acad Sci* 92: 5920-5924, 1995
22. Brown GL, Curtsinger LJ, White M, Mitchell RO, Pietsch J, Nordquist R, von Fraunhofer A, Schultz GS: Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- β . *Ann Surg* 208: 788-794, 1988
23. Brown GL, Curtsinger LJ, Jurkiewicz MJ, Nahai F, Schultz G: Stimulation of healing of healing of chronic wounds by epidermal growth factor. *Plast Reconstr Surg* 88: 189-, 1991
24. Buckley RC, Breazeale EE, Edmond JA, Brzezienski: A simple preparation of autologous fibrin glue for skin-graft fixation. *Plast Reconstr Surg* 103(1): 202-206, 1999
25. Carmeliet P: Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat Med* 6(3): 389-395, 2000

26. Carroll C, Carroll SM, Schuschke DA, Barker JH: Augmentation of skeletal muscle flap survival using Platelet Derived Growth Factor. *Plast Reconstr Surg* 102(2): 407-415, 1998
27. Castro FP: Role of activated growth factors in lumbar spinal fusions. *J Spinal Disord Tech* 17: 380-384, 2004
28. Cho BC, Lee MS, Lee JH, Bjun JS, Baik BS: The effects of surgical and chemical delay procedures on the survival of arterialized venous flaps in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 102(4):1134-1143, 1998
29. Colville-Nash PR, Willoughby DA: Growth factors in angiogenesis:current interest and therapeutic potential. *Mol Med Today* 3:14-23, 1997
30. Cormack GC, Lamberty BGH: Introduction and the microcirculation. In: *The Arterial Anatomy of Skin Flaps*, Editor: Cormack GC, Churchill Livingstone, London 1994, 1-32
31. Cormack GC, Lamberty BGH: The ischemic flap. In: *The Arterial Anatomy of Skin Flaps*, Editor: Cormack GC, Churchill Livingstone, London 1994, 47-69
32. Croveti G, Martinelli G, Issi M, Barone M, Guizzardi M, Campanati B, Moroni M, Carabelli A: Platelet gel for healing cutaneous chronic wounds. *Transfus Apher Sci* 30:145-151, 2004
33. Currie LJ, Sharpe JR, Martin R: The use of fibrin glue in skin grafts and tissue-engineered skin replacements: A Review. *Plast Reconstr Surg* 108(6): 1713-1726, 2001
34. Cutting C, Bardach J, Finseth F: Haemodynamics of the delayed skin flap: a total blood-flow study. *Br J Plast Surg* 34: 133-135, 1981

35. Cutting C, Robson MC, Koss N: Denervation supersensitivity and the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 61(6): 881-887, 1978
36. Daniel RK, Kerrigan CL: Principles and physiology of skin flap surgery. In: *Plastic Surgery*, Editor: McCarthy JG, JB Saunders Co, Philadelphia. 1: 275-276, 1990
37. Distler O, Neidhart M, Gay RE, Gay S: The molecular control of angiogenesis. *Intern Rev Immunol* 21:33-49, 2002
38. Dhar SC, Taylor IG: The delay phenomenon: The story unfolds. *Plast Reconstr Surg* 104(7): 2079-2091, 1999
39. Dorion D, Boyd JB, Pang CY: Augmentation of transmidline skin perfusion and viability in transverse rectus abdominis myocutaneous (TRAM) flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 88(4): 642-649, 1991
40. Douglas B, Buchholz RR: The blood circulation in pedicle flaps: An accurate test for determining its efficiency. *Ann Surg* 117(3): 692-709, 1943
41. Drake DB, Faulkner BC, Amiss LR, Spotnitz WD, Morgan RF: Thrombogenic effects of a nonthrombin-based fibrin sealant compared with thrombin-based fibrin sealant on microvenous anastomoses in a rat model. *Ann Plast Surg* 45(5): 520-524, 2000
42. Dunn RM, Mancoll J: Flap models in the rat: A review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg* 90(2): 319-328, 1992
43. Eriksson E, Robson MC: Experimental flap delay with formic acid. *Br J Plast Surg* 31: 238-241, 1978
44. Erol OO, Spira M: Microangiography: A detailed technique of perfusion. *J Surg Res* 29(5): 406-413, 1980

45. Fezza JP, Cartwright M, Mack W, Flaharty P: The use of aerosolized fibrin glue in face-lift surgery. *Plast Reconstr Surg* 110(2): 658-664, 2002
46. Finseth F, Adelberg MG: Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. *Plast Reconstr Surg* 61: 738-743, 1978
47. Finseth F, Cutting C: An experimental neurovascular island skin flap for the study of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 61(3): 412-420, 1978
48. Folkman J: Clinical applications of research on angiogenesis. *N Eng J Med* 333: 1757-1763, 1995
49. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
50. Folkman J, Shing Y: Angiogenesis. *J Biol Chem* 267(16):10931-10934, 1992
51. Freymiller EG, Agbaloo TL: Platelet –Rich Plasma: Ready or not? *J Oral Maxillofac Surg* 62: 484-488, 2004
52. Frost-Arner L, Spotnitz WD, Rodeheaver GT, Drake DB: Comparison of the thrombogenicity of internationally available fibrin sealants in an established microsurgical model. *Plast Reconstr Surg* 108(6): 1655-1660, 2001
53. Frostick SP, Yin Q, Kemp GJ: Schwann cells, neurotrophic factors, and peripheral nerve regeneration. *Microsurgery* 18(7): 397-405, 1998
54. Garcia PB, Nieto CS, Ortega JMR: Morphological changes in the vascularization of delayed flaps in rabbits. *Br J Plast Surg* 44: 285-290, 1991
55. Gatti JE, LaRossa D, Brousseau DA, Silverman DG: Assessment of neovascularization and timing of flap division. *Plast Reconstr Surg* 73(3): 396-402, 1984

56. Gehring S, Hoerauf H, Laqua H, Kirchner H, Klüter H: Preparation of autologous platelets for the ophthalmologic treatment of macular holes. *Transfusion* 39: 144-148, 1999
57. Giannini G, Mauro V, Agostino T, Gianfranco B: Use of autologous fibrin-platelet glue and bone fragments in maxillofacial surgery. *Transfus Apher Sci* 30:139-144, 2004
58. Gosain AK, Lyon VB: The current status of tissue glues: Part II. For adhesion of soft tissues. *Plast Reconstr Surg* 110(6): 1581-1584, 2002
59. Goshen J, Wexler MR, Peled JJ: The use of two alpha blocking agents, Phenoxybenzamine and Phentolamine in ointment and injection form to improve skin flap survival in rats. *Ann Plast Surg* 15: 431-435, 1985
60. Grabb WC: Classification of skin flaps. In: *Skin Flaps*, Editors: Grabb WC, Myers MB, Little Brown Comp, Boston 1975, 145-153
61. Green DM, Klink B: Platelet gel as an intraoperatively procured platelet-based alternative to fibrin glue. *Plast Reconstr Surg* 101(4): 1161-1162, 1998
62. Grotendorst GR, Martin GR, Pencev D, Sodek J, Harvey AK: Stimulation of granulation tissue formation by Platelet-derived Growth Factor in normal and diabetic rats. *J Clin Invest* 76:2323-2329, 1985
63. Gruber R, Karreth F, Frommlet F, Fischer MB, Watzek G: Platelets are mitogenic for periosteum-derived cells. *J Orthop Res* 21:941-948, 2003
64. Guba AM, Callahan J: Nutrient blood flow in delayed axial pattern skin flaps in pigs. *Plast Reconstr Surg* 64(3): 372-376, 1979

65. Gumener R, Montandon D: Distally based forearm fasciosubcutaneous flap: Discussion. *Plast Reconstr Surg* 114(2): 397-399, 2004
66. Gurunluoglu R, Ozer K, Skugor B, Lubiatowski P, Carnavale K, Siemionow M: Effect of transfection time on the survival of epigastric skin flaps pretreated with adenovirus encoding the VEGF gene. *Ann Plast Surg* 49(2):161-169, 2002
67. Hayward PG, Alison WE, Carp SS, Hui PS, Robson MC: Local infiltration of an angiogenic growth factor does not stimulate the delay phenomenon. *Br J Plast Surg* 44: 526-529, 1991
68. Hoopes JE, Su CT, Im MJ: Enzymatic responses to skin flap elevation following a delay procedure. *Plast Reconstr Surg* 66(3): 369-372, 1980
69. Hsu C, Alto P, Chang J: Clinical implications of growth factors in flexor tendon wound healing. *J Hand Surg* 29A(4): 551-563, 2004
70. Huang LH, Neiva EF, Soehren SE, Giannobile WV, Wang HL: The effect of platelet-rich plasma on the coronally advanced flap root coverage procedure: a pilot human trial. *J Periodontol* 76: 1768-1777, 2005
71. Huemer GM, Shafighi M, Meirer R, Debagge P, Piza-Katzer H, Gurunluoglu R: Adenovirus-Mediated Transforming Growth Factor- β ameliorates ischemic necrosis of epigastric skin flaps in a rat model. *J Surg Res* 121: 101-107, 2004
72. Johnson K, Hunt TK, Brennan SS: Tissue oxygen measurements delayed skin flaps: A reconsideration of the mechanisms of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 82: 328-336, 1988
73. Jurell G: Adrenergic nerves and the delay phenomenon. *Ann Plast Surg* 17: 493-497, 1986

74. Jurell G, Hjemdahl P, Ferdholm BB: On the mechanism by which antiadrenergic drugs increase survival of critical skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 72(4): 518-525, 1983
75. Jurell G, Jonsson CE: Increased survival of experimental skin flaps in rats following treatment with antiadrenergic drugs. *Scand J Plast Reconstr Surg* 10:169-172, 1976
76. Kanno T, Takahashi T, Tsujisawa T, Ariyoshi W, Nishihara T: Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg* 63: 362-369, 2005
77. Karacaoglu E, Yuksel F, Turan SO, Zienowicz RJ: Chemical delay: An alternative to surgical delay experimental study. *Ann Plast Surg* 49(1): 73-81, 2002
78. Kawase T, Okuda K, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma-derived fibrin clot formation stimulates collagen synthesis in periodontal ligament and osteoblastic cells in vitro. *J Periodontol* 74(6): 858-864, 2003
79. Kayser MR, Hodges PL: Surgical flaps. *Select Read Plast Surg* 8:1-58, 1995
80. Kerrigan CL: Skin flap failure: Pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 72(6): 766-777, 1983
81. Kerrigan CL, Rollin DK: Pharmacologic treatment of the failing skin flap. *Plast Reconstr Surg* 70(5): 541-549, 1982
82. Khouri RK, Brown DM, Leal-Khouri SM, Tark KC, Shaw WW: The effect of basic Fibroblast Growth Factor on the neovascularization process: skin flap survival and staged flap transfers. *Br J Plast Surg* 44: 585-588, 1991
83. Klagsbrun M, D'amore PA: Regulators of angiogenesis. *Annu Rev Physiol* 53:217-239, 1991

84. Klingenström P, Nylen B: Timing of transfer of tubed pedicles and cross-flaps. *Plast Reconstr Surg* 37(1): 1-12, 1966
85. Knighton DR, Fiegel VD, Austin LL, Ciresi KF, Butler EL: Classification and treatment of chronic nonhealing wounds: Successful treatment with autologous Platelet-derived wound healing factors(PDWHF). *Ann Surg* 204(3): 322-330, 1986
86. Knighton DR, Ciresi KF, Fiegel VD, Schumerth S, Butler EL, Cerra F: Stimulation of repair in chronic, nonhealing, cutaneous ulcers using platelet-derived wound healing formula. *Surg Gynecol Obstet* 170: 56-60, 1990
87. Kondo E, Yasuda K, Yamanaka M, Minami A, Tohyama H: Effects of administration of exogenous growth factors on biomechanical properties of the elongation-type anterior cruciate ligament injury with partial laceration. *Am J Sports Med* 33(2): 188-196, 2005
88. Krupski WC, Reilly LM, Perez S, Moss KM, Crombleholme PA, Rapp JH: A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors for treatment of chronic nonhealing wounds: Apreliminary report. *J Vasc Surg* 14(4): 526-536, 1991
89. Ksander GA, Sawamura SJ, Ogawa Y, Sundsmo J, McPherson JM: The effect of platelet releasate on wound healing in animal models. *J Am Acad Dermatol* 22(5): 781-791, 1990
90. Kulber AD, Bacilious N, Peters E, Gayle LB, Hoffman L: The use of fibrin sealant in the prevention of seromas. *Plast Reconstr Surg* 99(3): 842-851, 1997

91. Landesberg R, Roy M, Glickman RS: Quantification of growth factor levels using a simplified method of platelet-rich Plasma Gel preparation. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 297-300, 2000
92. Lin G, Chen KC, Hsieh PS, Yeh CH, Lue TF, Lin CS: Neurotrophic effects of vascular endothelial growth factor and neurotrophins on cultured major pelvic ganglia. *BJU Int.* 92(6): 631-635, 2003
93. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, Oswald TM, Cui D, Zhang F: Vascular Endothelium Growth Factor, surgical delay and skin flap survival. *Ann Surg* 239(6): 866-875, 2004
94. Lopez JLA, Nieto CS, Garcia PB, Ortega JMR: Evaluation of angiogenesis in delayed skin flaps using a monoclonal antibody for the vascular endothelium. *Br J Plast Surg* 48: 479-486, 1995
95. Lynch SE, Colvin RB, Antoniades HN: Growth factors in wound healing. *J Clin Invest* 84:640-646, 1989
96. Lynch SE, Genco RJ, Marx RE: Platelet-Rich Plasma: A source of multiple autologous growth factors for bone grafts. In: *Tissue Engineering, Applications in Maxillofacial Surgery and Periodontics*. Ed: Carol Stream, Quintessence Publishing Co, Illinois, 1999:71-83
97. Machens HG, Salehi J, Weich H, Münch S, Siemers F, Krapohl BD, Herter KH, Krüger S, Reichert B, Berger A, Vogt P, Mailänder P: Angiogenic effects of injected VEGF₁₆₅ and sVEGF-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *J Surg Res* 111:136-142, 2003

98. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE: The use of autologous platelet-rich plasma (Platelet Gel) and autologous platelet-poor plasma (Fibrin Glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg* 107(1): 229-239, 2001
99. Marek CA, Amiss LR, Morgan RF, Spotnitz WD, Drake DB: Acute thrombogenic effects of fibrin sealant on microvascular anastomosis in a rat model. *Ann Plast Surg* 41(4): 415-419, 1998
100. Margolis DJ, Kantor J, Santanna J, Strom BL, Berlin JA: Effectiveness of platelet releasate for the treatment of diabetic neuropathic foot ulcers. *Diabetes Care* 24: 483-488, 2001
101. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM: Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Path Oral Radiol Endod* 85: 638-646, 1998
102. Marx RE: Quantification of growth factor levels using a simplified method of Platelet-Rich plasma gel preparation: Discussion. *J Oral Maxillofac Surg* 58: 300-301, 2000
103. Mathes SJ, Hansen SL: Flap classification and applications. In: *Plastic Surgery*, Editors: Mathes SJ, Hentz VR, Saunders Elsevier, 2nd ed. Philadelphia, 2006: 365-379
104. Matras H: Fibrin seal: the state of the art. *J Oral Maxillofac Surg* 43:605-611, 1985
105. Mazzucco L, Medici D, Serra M, Panizza R, Rivara G, Orecchia S, Libener R, Cattana E, Levis A, Beta PG, Borzini P: The use of autologous platelet gel to treat difficult-to-heal wounds: a pilot study. *Transfusion* 44: 1013-1018, 2004
106. McFarlane RM, Heagy FC, Rodin S, Aust SC, Wermuth RE: A study of the delay phenomenon in experimental pedicle flaps. *Plast Reconstr Surg* 35:245-262, 1965

107. McGee GS, Davidson JM, Buckley A, Sommer A, Woodward SC, Aquino AM, Barbour R, Demetriou AA: Recombinant Basic Fibroblast Growth Factor accelerates wound healing. *J Surg Res* 45: 145-153, 1988
108. McGee GS, Broadley KN, Buckley A, Aquino A, Woodward SC, Demetriou AA, Davidson JM: Recombinant Transforming Growth Factor Beta accelerates incisional wound healing. *Curr Surg* 46: 103-106, 1989
109. Midha R, Munro CA, Dalton PD, Tator CH, Soichet MS: Growth factor enhancement of peripheral nerve regeneration through a novel synthetic hydrogel tube. *J Neurosurg* 99(3): 555-565, 2003
110. Morris SF, Taylor GI: Predicting the survival of experimental skin flaps with a knowledge of the vascular architecture. *Plast Reconstr Surg* 92(7): 1352-1361, 1993
111. Myers MB: Attempts to augment survival in skin flaps- Mechanism of the delay phenomenon. In: *Skin Flap*, Editors: Grabb WC, Myers MB, Little Brown Comp, Boston 1975, 63-79
112. Myers MB: Investigation of skin flap necrosis. In: *Skin Flap*, Editors: Grabb WC, Myers MB, Little Brown Comp, Boston 1975, 3-10
113. Myers MB, Cherry G: Augmentation of tissue survival by delay: An experimental study in rabbits. *Plast Reconstr Surg* 39(4): 397-401, 1967
114. Myers MB, Cherry G: Differences in the delay phenomenon in the rabbit, rat and pig. *Plast Reconstr Surg* 47(1): 73-78, 1971
115. Nakajima T: How soon do venous drainage channels develop at the periphery of a free flap? A study in rats. *Br J Plast Surg* 31: 300-308, 1978

116. Nall AV, Brownlee RE, Colvin CP, Schultz G, Fein D, Cassisi NJ, Nguyen T, Karla A. Transforming Growth Factor- β 1 improves wound healing and random flap survival in normal and irradiated rats. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 122(2): 171-177, 1996
117. Neligan P, Pang CY, Nakatsuka T, Lindsay WK, Thomson HG: Pharmacologic action of Isoxsuprine in cutaneous and myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg* 75(3): 363-374, 1985
118. Okuda K, Kawase T, Momose M, Murata M, Saito Y, Suzuki H, Wolff LF, Yoshie H: Platelet-rich plasma contains high levels of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta and modulates the proliferation of periodontally related cells in vitro. *J Periodontol* 74(6): 849-857, 2003
119. Oliver DW, Hamilton SA, Fogle AA, Wood SH, Lamberty GH: A prospective, randomized, double-blind trial of the use of fibrin sealant for face lifts. *Plast Reconstr Surg* 108(7): 2101-2107, 2001
120. O'Toole G, MacKenzie D, Buckley MF, Lindeman R, Poole M: A review of therapeutic angiogenesis and consideration of its potential applications to plastic and reconstructive surgery. *Br J Plast Surg* 54:1-7, 2001
121. Oya T, Zhao YL, Takagawa K, Kawaguchi M, Shirakawa K, Yamauchi T, Sasahara M: Platelet-derived growth factor- β expression induced after rat peripheral nerve injuries. *Glia*. 38(4): 303-312, 2002
122. Padubidri AN, Browne E: Modification in flap design of the epigastric artery flap in rats: a new experimental flap model. *Ann Plast Surg* 39: 500-504, 1997

123. Pang CY, Forrest CR, Morris SF: Pharmacological augmentation of skin flap viability: A hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishful thought. *Ann Plast Surg* 22: 293-306, 1989
124. 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* 78(1): 68-74, 1986
125. Pang CY, Neligan PC, Forrest CR, Nakatsuka T, Sasaki GH: Hemodynamics and vascular sensitivity to circulating norepinephrine in normal skin and delayed and acute random skin flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 78(1): 75-84, 1986
126. Partsafas AW, Bascom DA, Jorgensen SA, Wax MK: Effects of Tisseel and FloSeal on primary ischemic time in a rat fasciocutaneous free flap model. *Laryngoscope* 114: 301-304, 2004
127. Petersen W, Pufe T, Zantop T, Tillmann B, Mentlein R: Hypoxia and PDGF have a synergistic effect that increases the expression of the angiogenic peptide Vascular Endothelial Growth Factor in Achilles tendon fibroblasts. *Arch Orthop Trauma Surg* 123: 485-488, 2003
128. Pierce GF, Mustoe TA, Altrock BW, Deuel TF, Thomason A: Role of Platelet-Derived Growth Factor in wound healing. *J Cell Biochem* 45: 319-326, 1991
129. Rashid MA, Akita S, Razzaque MS, Yoshimoto H, Ishihara H, Fujii T, Tanaka K, Taguchi T: Coadministration of basic Fibroblast Growth Factor and Sucrose Octasulfate (Sucrafate) facilitates the rat dorsal flap survival and viability. *Plast Reconstr Surg* 103(3): 941-948, 1999

130. Reed GL, Fitzgerald ML, Polgar J: Molecular mechanisms of platelet exocytosis: insights into the “secrete” life of thrombocytes. *Blood* 96(10): 3334-3342, 2000
131. Reinisch JF: The pathophysiology of skin flap circulation: The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 54(5): 585-598, 1974
132. Rendu F, Brohard-Bohn B: The platelet release reaction: granules’ constituents, secretion and functions. *Platelets* 12(5): 261-273, 2001
133. Ribatti D, Vacca A, Presta M: The discovery of angiogenic factors: A historical review. *Gen Pharmacol* 35:227-231, 2002
134. Roesel JF, Nanney LB: Assessment of differential cytokine effects on angiogenesis using an in vivo model of cutaneous wound repair. *J Surg Res* 58: 449-459, 1995
135. Sanchez M, Azofra J, Anitua E, Andia I, Padilla S, Santisteban J, Mujika I: Plasma rich in growth factors to treat an articular cartilage avulsion: a case report. *Med Sci Sports Exerc* 35:1648-1652, 2003
136. Sasaki A, Harii K: Lack of effect of Isoxsuprine on experimental random flaps in the rat. *Plast Reconstr Surg* 66(1): 105-108, 1980
137. Sasaki GH, Pang CY: Pathophysiology of skin flaps raised on expanded pig skin. *Plast Reconstr Surg* 74(1): 59-67, 1984
138. Schmidt MB, Chen EH, Lynch SE: A review of the effects of insulin-like growth factor and platelet derived growth factor on in vivo cartilage healing and repair. *Osteoarthritis Cartilage* 14: 403-412, 2006
139. Serafin D, Shearin C, Georgiade NG: The vascularization of free flaps: Aclinical and experimental correlation. *Plast Reconstr Surg* 60(2): 233-241, 1977

140. Siebrecht MA, De Rooij PP, Arm DM, Olsson ML, Aspenberg P: Platelet concentrate increases bone ingrowth into porous hydroxyapatite. *Orthopedics* 25(2): 169-172, 2002
141. Snyder EL, Calhoun BC: Topical platelet growth factor therapy: of lotions and potions. *Transfusion* 41: 1186-1189, 2001
142. Spindler KP, Nanney LB, Davidson JM: Proliferative responses to Platelet-Derived Growth Factor in young and old rat patellar tendon. *Connect Tissue Res* 31(2): 171-177, 1995
143. Steed DL: Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. *J Vasc Surg* 21: 71-81, 1995
144. Stein LE: Effects of serum, Fibroblast Growth Factor, and Platelet-Derived Growth factor on explants of rat tail tendon: Amorphological study. *Acta Anat* 123: 247-252, 1985
145. Suzuki S, Isshiki N, Ohtsuka M, Maeda T: Experimental study on “delay” phenomenon in relation to flap width and ischaemia. *Br j Plast Surg* 41: 389-394, 1988
146. Suzuki S, Isshiki N, Ogawa Y, Goto M, Hayashi O: The minimal requirement of circulation for survival of undelayed and delayed flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 78(2): 221-227, 1986
147. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM: Therapeutic Angiogenesis. *J Clin Invest* 93:662-670, 1994
148. Taylor GI, Corlett RJ, Caddy CM, Zelt RG: An anatomic review of the delay phenomenon: II. Clinical Applications. *Plast Reconstr Surg* 89(3): 408-418, 1992

149. Taylor GI, Palmer JH: The vascular territories (Angiosomes) of the body: Experimental study and clinical applications. *Br J Plast Surg* 40: 113-141, 1987
150. Thorn JJ, Sørensen H, Wels-Fogh U, Andersen M: Autologous fibrin glue with growth factors in reconstructive maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg* 33:95-100, 2004
151. Tiangco DA, Papakonstantineu KC, Mullinax KA, Terzis JK: IGF-I and end-to-side nerve repair: a dose response study. *J Reconstr Microsurg* 17(4): 247-256, 2001
152. Toomey JM, Conoyer JM, Oguna JH: Vasodilating agents in augmentation of skin flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 87(6): 757-762, 1979
153. Tsur H, Daniller A, Strauch B: Neovascularization of skin flaps: Route and timing. *Plast Reconstr Surg* 66(1): 85-93, 1980
154. Valbonesi M: Fibrin glue and cryo-platelet gel for surgical application in Italy. *Transfus Apher Sci* 30:137-138, 2004
155. Valbonesi M, Giannini G, Migliori F, Dalla Costa R, Gali A: The role of autologous fibrin-platelet glue in plastic surgery: A preliminary report. *Int J Artif Organs* 25: 334-338, 2002
156. Vedder NB: Flap physiology. In: *Plastic Surgery*, Editors: Mathes SJ, Hentz VR, Saunders Elsevier, 2nd ed. Philadelphia, 2006: 483-506
157. Vibe P, Pless J: A new method of skin graft adhesion. *Scand J Plast Reconstr Surg* 17: 263-264, 1983
158. Vikjær D, Blom S, Hjørting-Hansen E, Pinholt EM: Effect of platelet-derived growth factor-BB on bone formation in calvarial defects: an experimental study in rabbits. *Eur J Oral Sci* 105: 59-66, 1997

159. Wang XT, Liu PY, Tang JB: Tendon healing in vitro: Genetic modification of tenocytes with exogenous PDGF gene and promotion of collagen gene expression. *J Hand Surg* 29A(5): 884-890, 2004
160. Weibrich G, Kleis WKG, Buch R, Hitzler WE, Hafner G: The Harvest Smart PRePTM system versus the Friadent-Schütze platelet-rich plasma kit. *Clin Oral Impl Res* 14:233-239, 2003
161. Weiler A, Förster C, Hunt P, Falk R, Jung T, Unterhauser FN, Bergmann V, Schmidmeier G, Haas NP: The influence of locally applied Platelet-Derived Growth Factor-BB on free tendon graft remodelling after anterior cruciate ligament reconstruction. *Am J Sports Med* 32(4): 881-891, 2004
162. Wexler MR, Kalisman M, Yeschura R: The effect of Phenoxybenzamine, Phentolamine and 6-Hydroxydopamine on skin flap survival in rats. *J Surg Res* 19(2): 83-86, 1975
163. Whitman DH, Berry RL, Green DM: Platelet Gel: An autologous alternative to fibrin glue with applications in oral and maxillofacial surgery. *J Oral Maxillofac Surg* 55: 1294-1299, 1997
164. Wong MWN, Tang YYN, Lee SKM, Fu BSC, Chan BP, Chan CKM: Effect of Dexamethasone on cultured human tenocytes and its reversibility by Platelet-Derived Growth Factor. *J Bone Joint Surg* 85A(10):1914-1920, 2003
165. Yazawa M, Ogata H, Kimura A, Nakajima T, Mori T, Watanabe N: Basic studies on the bone formation ability by platelet rich plasma in rabbits. *J Craniofac Surg* 15(3): 439-446, 2004

166. Young CMA: The revascularization of pedicle skin flaps in pigs: A functional and morphologic study. *Plast Reconstr Surg* 70(4): 455-464, 1982
167. Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC: Growth factors and flap survival. *Microsurgery* 24(3): 162-167, 2004
168. Zhang F, Fischer K, Timek EK, Guo M, Cui D, Martin WD, Buncke HJ, Lineaweaver WC: Improvement of skin paddle survival by application of vascular endothelial growth factor in a rat TRAM flap model. *Ann Plast Surg* 46: 314-319, 2001
169. Zhang F, Richards L, Angel MF, Zhang J, Liu H, Dorsett-Martin W, Lineaweaver WC: Accelerating flap maturation by vascular endothelium growth factor in a rat tube flap model. *Br J Plast Surg* 55: 59-63, 2002
170. Zhang F, Lei MP, Oswalda TM, Pangb Y, Blaina B, Caib ZW, Lineaweaver WC: The effect of vascular endothelial growth factor on the healing of ischaemic skin wounds. *Br J Plast Surg* 56: 334-341, 2003
171. Zhang F, Oswalda T, Linb S, Caib Z, Leia M, Jonesa M, Angela MF, Lineaweaver WC: 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
172. Zimmermann R, Jakubietz R, Jakubietz M, Strasser E, Schlegel A, Wiltfang J, Eckstein R: Different preparation methods to obtain platelet components as a source of growth factors for local application. *Transfusion* 41: 1217-1224, 2001