

İSKEMİ-REPERFÜZYON YARALANMASINDA NİTRİK OKSİT KULLANIMININ KAS FLEBİ MİKROSİRKÜLASYONUNA ETKİLERİ (Deneysel Çalışma)

Murat TÜREGÜN, Mustafa NİŞANCI, Haluk DUMAN, Naki SELMANPAKOĞLU

GATA Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Ankara

ÖZET

Son yıllarda yapılan çalışmalar iskemi sonrası reperfüzyona bağlı doku yaralanmasının ve "no-reflow" fenomeninin gelişiminde lökositlerin anahtar bir role sahip olduğunu ortaya koymuştur. Nitrik oksit (NO) vasküler endotelium tarafından üretilen biyolojik olarak aktif bir bileşiktir. Bu çalışmada, iskemi sonrası reperfüzyona bağlı lökosit-endotel etkileşim basamaklarının eksojen NO tarafından inhibe edilebildiğinin, rat kremaster kas flebi modelinde mikrosirkülasyon seviyesinde gösterilmesi amaçlandı.

MATERYAL-METOD: 24 erkek Sprague-Dawley ratı, her biri 8 rattan oluşan 3 gruba ayrıldı. Kremaster ada flebi kaldırıldı, Grup I (Kontrol)de iskemi-reperfüzyon uygulanmadı. Kremaster ada flebi kaldırılıp 4 saat iskemi uygulanıp, klempler açılmadan 20 dakika önce karşı taraf femoral veninden grup II (Yalnız I/R) de serum fizyolojik, grup III(I/R + NO)te sodyum nitroprussid verildi. Takiben 24 saat reperfüzyon uygulandı. İntravital mikroskopi sistemi kullanılarak, flep damar çapları, yuvarlanan, yapışan, göçeden lökositler ve perfüze kapillerler ölçüldü.

BÜLGULAR: Reperfüzyondan 20 dakika önce sistemik olarak verilen NO donörü ile postkapiler venüllerde yuvarlanan, yapışan ve göçeden lökosit miktarlarında iskemik kontrol grubuna göre anlamlı düşüş, ana arteriol çapında ve perfüze kapiler miktarında anlamlı yükseliş elde ettik.

SONUÇ: I/R yaralanmasında, NO donörlerinin lökosit-endotel hücreleri arasında etkileşimlerine inhibitör etkisini bir kas flebi modelinde mikrosirkülasyon seviyesinde intravital olarak ilk defa bu çalışmamızla gösterdik. Sonuçlarımız, NO'ın lökosit-endotel yapışma etkileşimlerini engelleyerek kas fleplerinde, iskemi/reperfüzyon yaralanmasının engellenmesi veya etkisinin azaltılmasında faydalı olabileceğini düşündürdü.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit, iskemi-reperfüzyon yaralanması, kremaster kas flebi, mikrosirkülasyon

SUMMARY

Recent studies have demonstrated that leukocyte-endothelial cell interactions play a key role in the mechanism of ischemia-reperfusion injury and no-reflow phenomenon. Nitric oxide (NO) is an active molecule produced by vascular endothelium. In this study, we sought to determine if the steps of leukocyte-endothelium interaction following ischemia-reperfusion (I/R) is modulated by NO in a rat cremaster muscle flap model at microcirculatory level.

MATERIAL-METHOD: 24 male Sprague-Dawley rats were divided into three groups : Group I(Control): Cremaster muscle island flaps were dissected for baseline measurements.. Group II(I/R): The prepared cremaster flap was subjected to 4 hours of ischemia and 24 hours of reperfusion. Group III(I/R +NO): The muscle flap was subjected to I/R as in group II, and sodium nitroprusside were injected into contralateral femoral vein 20 minutes before reperfusion. The diameters of vessels, numbers of rolling, sticking, and transmigrating neutrophils, number of perfused capillaries were observed in vivo under an intravital microscopy system. One-way ANOVA and Tukey tests were used for statistical evaluation.

RESULTS: There were significant increases in vessel diameters and perfused capillaries between I/R and NO grup. NO caused significant decreases in the number of rolling, sticking and transmigrating neutrophils comparing the I/R alone group.

CONCLUSION: We demonstrated the inhibitory effects of NO in leukocyte-endothelial cell interaction and subsequent increased capillary perfusion in I/R injury in a muscle flap model at microcirculatory level for the first time. Our results suggested us NO may be used in order to attenuate the effects of I/R in muscle flaps.

Key Words: Nitric oxide, ischemia-reperfusion injury, cremaster muscle flap, microcirculation

GİRİŞ

Rekonstrüktif cerrahide serbest doku transferleri rekonstrüksiyonu güç veya mümkün olmayan bir çok olgunun mükemmel sonuçlar ile tedavisini olası kılmıştır. Ancak özellikle serbest kas flebi transferlerinde, uzayan iskemi zamanına bağlı gelişen reperfüzyon yaralanması ve “no-reflow” ile flep kaybı halen üzerinde durulması gerekli bir sorun olarak gündemdeki yerini korumaktadır. Uzun süreli iskemiye maruz kalmış dokunun reperfüzyonu genellikle mikrovasküler disfonksiyon ve “no-reflow” fenomeninin gelişimi ile sonuçlanır. Kan akımı yeniden sağlandığında, yeterli perfüzyon basıncının tekrar oluşturulmasına rağmen kapillerlerin önemli bir miktarı tekrar perfüze olmaz. Son yıllarda yapılan çalışmalar iskemi sonrası reperfüzyona bağlı doku yaralanmasının ve “no-reflow” fenomeninin gelişiminde lökositlerin anahtar bir role sahip olduğunu, inflamasyonun esasını oluşturan lökosit- endotel ilişkisinin nasıl etkilenebileceğini öğrenmenin iskemi-reperfüzyon(I/R) yaralanmasının engellenmesini sağlayabileceğini ortaya koymuştur^{1,2}. Lökositlerin damar içinden çıkarak dokulara geçmesi için, endotelial hücrelerden ve lökositlerden salgılanan birçok mediatörün yönettiği karmaşık bir olay zincirinin gerçekleşmesi gerekir. Lökosit-endotelial hücre ilişkisinin ilk basamağında, lökositler ana kan akımından ayrılarak endotel yüzeyde yavaşça yuvarlanmaya başlar. Bu yuvarlanma aşaması, P-Selectin, E-Selectin ve L-Selectin adı verilen selektin grubu adezyon molekülleri tarafından yönetilir. Lökosit yuvarlanmaya başladıktan sonra platelet aktive edici faktör(PAF), lökotrien B4(LTB4), C5a tarafından yönetilen integrin grubu moleküllerin (CD11, CD18) etkisiyle endotel yüzeye yapışma aşamasına girebilir. İntersellüler adezyon molekülleri (ICAM-1 ve ICAM-2/ CD54) lökositin endotel tarafından tamamen yakalanmasını sağlar. Daha sonra bir Ig gen üstgrubu üyesi olan ve intersellüler birleşimlerde yoğunlaşmış olan platelet-endotelial hücre adezyon molekülü (PECAM-1) aracılığı ile transmigrasyon gerçekleşir.^{3,4}

Nitrik oksit (NO) vasküler endotelium tarafından üretilen ve süperoksit tarafından süratle yıkılan biyolojik olarak aktif bir bileşiktir. Son yıllarda NO'in iskemi-reperfüzyon yaralanması ve lökosit-endotel ilişkilerine etkisi üzerinde yapılan çoğu invitro çalışmalar, NO'in bu ilişkide modülatör etkisi olabileceğini göstermiştir.⁵⁻⁷

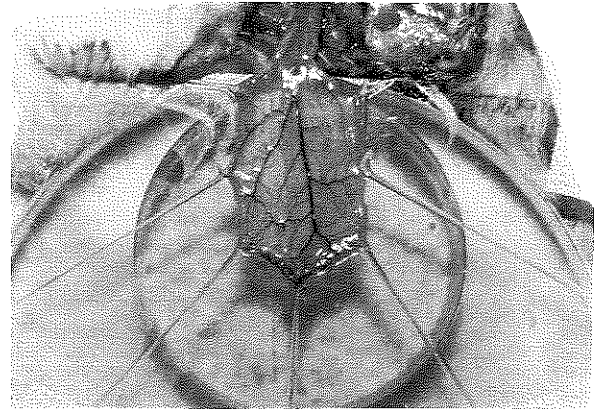
Bu çalışmada, iskemi sonrası reperfüzyona bağlı lökosit-endotel etkileşim basamaklarının eksojen NO tarafından inhibe edilebildiğinin, kas flebi modelinde mikrosirkülasyon seviyesinde gösterilmesi amaçlandı.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu araştırma, GATA Araştırma Kurulu tarafından

onaylanarak, GATA Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı ve Araştırma Merkezi imkanları ile gerçekleştirildi. Bu çalışmada 24 adet, 130-150 gram ağırlığında, erkek Sprague-Dawley rat kullanıldı. Tüm deneklerin temini ve beslenmesi GATA Araştırma merkezi tarafından sağlandı. Anestezi, xylazine hidroklorür (Rompun-BAYER, 0.2cc / gram) ve ketamin hidroklorür (Ketamin-PARKE DAVIS, 0.2cc / gram) kombinasyonunun intramusküler olarak uygulanması ile sağlandı ve her 30 dakikada bir 0.2cc intramusküler ketamin dozu ile idame ettirildi. Operasyon ve deney süresi boyunca denegın vücut ısısı rektal ısı probu ile monitorize edildi (Datascop-ABD) ve ısı lambası yardımı ile 35-37°C arasında korundu. Denekler deney sonu yüksek doz intrakardiyak anestetik madde enjeksiyonu ile sakrifiye edildiler.

Cerrahi Teknik: Cerrahi, 2 aşamada gerçekleştirildi. I.aşamada, anesteziyi takiben denegın sağ alt abdominal ve skrotal bölgesindeki tüyleri traş edildi. Ventral inguinal insizyonla, testis ve spermatik kordonu da içeren kremaster kası bütün olarak karın duvarından diseke edildi. Testis ve spermatik kordonun ekstraksiyonunu takiben pudik-epigastrik pedikülü üzerinde kremaster kas flebi tüp şeklinde kaldırıldı ve aynı taraf arka bacağının anteromedialinde hazırlanan subkutan tünele yerleştirildi. Eşlik eden genitofemoral sinir kesildi. Kontrol grubu hariç diğer gruptakilerde, flep proksimali ve distalinde femoral arter ve venin 4 saat süre ile klampe edilmesi ile iskemi oluşturuldu. Daha sonra klempler gevşetilip insizyonlar sütüre edildi ve 24 saat süre ile reperfüzyon sağlandı. II.aşamada kremaster tüp flebi bacadaki tünelden çıkartılarak, önyüzünün kesici koter ile açılması ile yuvarlak flep haline getirildi. Denek özel yapılmış pleksiglas doku banyosu üzerinde sabitlendikten sonra kas, bu düzenek üzerine yayıldı ve 5/0 ipeklerle tespit edildi. Flep üzeri oksijen geçirmeyen plastik film (Saran Wrap) ile



Şekil 1: Rat kremaster flebinin doku banyosu üzerine yayıldıktan sonra, intravital mikroskopi için hazırlanmış hali

kapatıldı.(Şekil 1)

24 erkek Sprague-Dawley ratı her biri 8 rattan oluşan 3 gruba ayrıldı:

Grup I (Kontrol): Kremaster ada flebi kaldırıldı, ancak iskemi-reperfüzyon uygulanmadı. Böylece flep mikrosirkülasyonunun temel değerleri ortaya kondu.

Grup II (Yalnız I/R): Kremaster ada flebi kaldırılıp 4 saat iskemi periodunda, klempler açılmadan 20 dakika önce karşı taraf femoral veninden 2.2 ml/kg serum fizyolojik verildi. Takiben 24 saat reperfüzyon uygulandı.

Grup III(I/R + NO): Kremaster ada flebi kaldırılıp, 4 saatlik iskemiye takiben, klempler açılmadan 20 dakika önce karşı taraf femoral veninden 5 mg/kg sodyum nitroprussid(Na-NP) (Nipruss, 60 mg/5 ml, Adeka) verildi. Takiben 24 saat reperfüzyon uygulandı.

İntravital Mikrosirkülasyon Gözlemi

Cerrahinin II.aşaması sonrası, 60 dakikalık denge periodundan sonra ölçümler yapıldı. Doku banyosundaki flep aşağıdan verilen fiberoptik tungsten lamba yardımıyla transillumine edildi. Kremaster kasının mikrosirkülasyonunu izlemek için ICS optik (Infinity Color-corrected System) teknolojisine sahip olan mikroskop (Zeiss, Axiophot model trioküler, Almanya) kullanıldı. Sisteme, video kamera(Sony CCD-IRIS, Japonya), video kayıt cihazı (Panasonic AG-7350, Japonya) ve monitör (Sony Trinitron, 17 inch, Japonya) eklenerek, tüm mikrosirkülasyon video kasetlere kaydedildi. Son görüntü 1800X büyütme sağlamaktaydı.

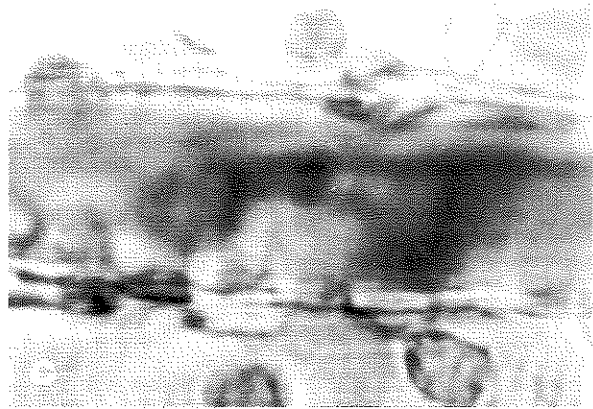
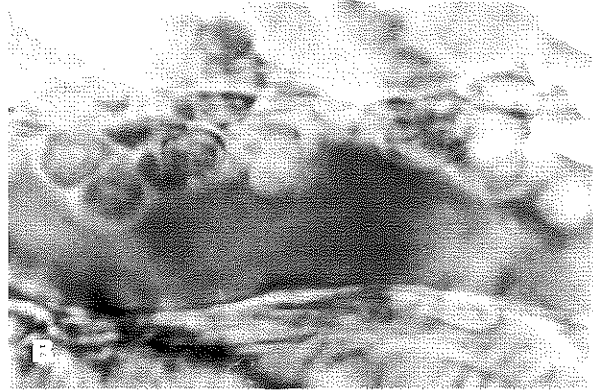
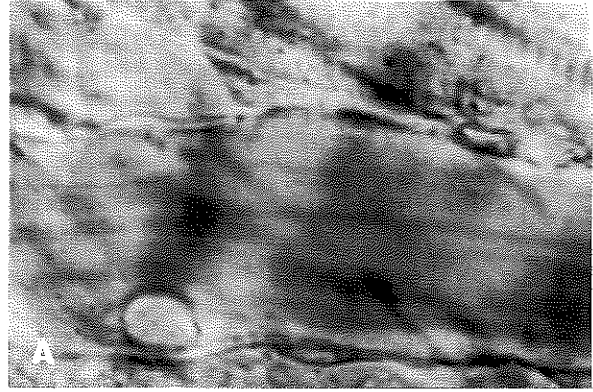
Damar Çapları: Kremaster arteriol ve venüllerinin çap ve duvar kalınlıkları ölçümü için mikrometrik lam monitöre yansıtıldı ve bu görüntüden kalibrasyon yapılarak ölçümler yapıldı.

Lökosit aktivasyonu: Flebin proksimal, orta ve distal bölgelerinde, her bölge için bir adet olmak üzere, tek, dallanmamış 30-40 mm çapında postkapiler venüller seçildi. Her venüde, 2 dakika süre ile a)yuvarlanan, b) yapışmış (20 saniyeden fazla hareketsiz kalan), c) göçetmiş (damar duvarından perivenüler interstisyuma geçen) lökositler sayıldı. (Şekil 2) Daha sonra bu 3 bölgedeki sayıların ortalaması alınarak her parametreye göre flep için geçerli rakam saptandı.

Perfüze kapilerler: Proksimal, orta ve distal bölgelerde, lökosit aktivasyonu gözlemi yapılan postkapiler venüle bitişik 9 alanda perfüze kapilerler sayıldı. Toplam 27 alanın ortalaması alınarak flep için geçerli rakam bulundu.

İstatistiksel Değerlendirme

Lökosit yuvarlanması, yapışması, göçetmesi ve perfüze kapilerlerin ortalamaları gözönüne alınarak, gruplara kendi aralarında ve kontrol grubu ile tek yönlü varyans analizi uygulandı. 0.05'ten küçük p değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi. Multipl karşılaştırma için Tukey testi yapıldı.



Şekil 2A: Kontrol grubuna ait bir flepte normal mikrosirkülasyon izlenmekte I/R'nin neden olduğu. **B:** yuvarlanan ve yapışkan, **C:** göçeden lökositlerdeki artış izlenmekte

SONUÇLAR

Sonuçlar Tablo 1'de özetlenmektedir.

I.Damar Çapları I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma(124.8± 13.5 karşılık 86.2±17.4, p<0.01) varken NO grubunda I/R grubuna

Tablo 1: Sonuçların Özeti

Parametre	Kontrol Grup I	I/R Grup II	I/R + NO Grup III	II ve III arasındaki fark	P*
Ana Arteriol Çapı (ortalama ±SD)	124.8± 13.5	86.2±17.4	120.8± 15.5	% 40.1	< 0.01
Yuvarlanan lökositler (ortalama ±SD)	9.3 ± 3.2	29.4 ± 2.2	11.3 ± 2.6	% 61.5	<0.001
Yapışan lökositler (ortalama ±SD)	3.7 ± 0.6	11.5 ± 2.1	5.4 ± 1.4	% 53.1	<0.001
Göçeden lökositler (ortalama ±SD)	2.7 ± 0.9	7.9 ± 1.8	3.6±1.2	% 54.4	<0.01
Perfüze kapillerler (ortalama ±SD)	6.4 ± 0.6	3.3 ± 0.8	5.5 ± 0.6*	% 40	<0.01

* p<0.05 anlamlı olarak değerlendirildi. Tek yönlü varyant analizi kullanıldı.

göre anlamlı artış vardı.(120.8± 15.5, p<0.01)

II.Lökosit Aktivasyonu

a.Yuvarlanan Lökositler : I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış (9.3 ± 3.2 karşılık 29.4 ± 2.2, p<0.001) varken NO grubunda I/R grubuna göre anlamlı azalma vardı.(11.3 ± 2.6, p<0.001) (Tablo 1, Şekil 3)

b.Yapışan Lökositler: I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış (3.7 ± 0.6 karşılık 11.5 ± 2.1, p<0.001) varken NO grubunda I/R grubuna göre anlamlı azalma vardı.(5.4 ± 1.4, p<0.001) (Tablo 1, Şekil 3)

c.Göç Eden Lökositler: I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir artış (2.7 ± 0.9 karşılık 7.9 ± 1.8, p<0.001) varken NO grubunda I/R grubuna göre anlamlı azalma vardı.(3.6 ± 1.2, p<0.01) (Tablo 1, Şekil 3)

III. Perfüze Kapillerler

I/R grubunda kontrol grubuna göre anlamlı bir azalma(6.4± 0.6 karşılık 3.3±0.8, p<0.01) varken NO grubunda I/R grubuna göre anlamlı artış vardı.(5.5± 0.6, p<0.01) (Tablo 1, Şekil 4)

TARTIŞMA

I/R yaralanmasında postkapiler venülerde nötrofil yapışmasının ve göçünün arttığı çeşitli invivo çalışmalarda gösterilmiştir.⁸⁻¹¹ Bu inflamatuvar yanıt geniş olarak araştırıldıysa da altta yatan mekanizmalar halen tam olarak anlaşılammıştır. Endotel hücre kaynaklı nitrik oksidin, bu yanıtta hücre yapışma moleküllerine bağlı lökosit-endotel etkileşimindeki rolü, halen araştırma konusudur.

İskemik bir vasküler yatağın reperfüzyonunu takiben gelişen endotelial disfonksiyonun en erken bulgularından birisi, endotelial NO salınımında azalmadır.⁷ Bu azalma, reperfüzyon sonrası 2,5 ila 5 dakika içinde ortaya çıkıp, saatlerce sürer. Nitrik oksit inaktivasyonunun I/R yaralanması patogenezinde rol oynadığı düşüncesi, kaybedilmiş veya azalmış NO'in

erken dönemde yerine koyulması ile reperfüzyon injurisinin engellenmesi veya şiddetinin azaltılması fikrini getirmektedir. Bizim çalışmamız, bir kas flebi modelinde oluşturulan I/R injurisinde, nitrik oksit tedavisiyle inflamatuvar yanıtın azalacağı ve mikrosirkülasyon seviyesinde flep dolaşımının artacağı hipotezine dayanmıştır.

Bu tedavi yaklaşımı myokardiyal iskemi-reperfüzyonda deneysel olarak uygulanmış, bütün NO replasman alternatifleri denenmiş ve azalmış PMNL yapışması, PMNL infiltrasyonu ve azalmış doku yaralanması saptanmıştır.¹² Daha sonra, iskemi-reperfüzyon yaralanmasında

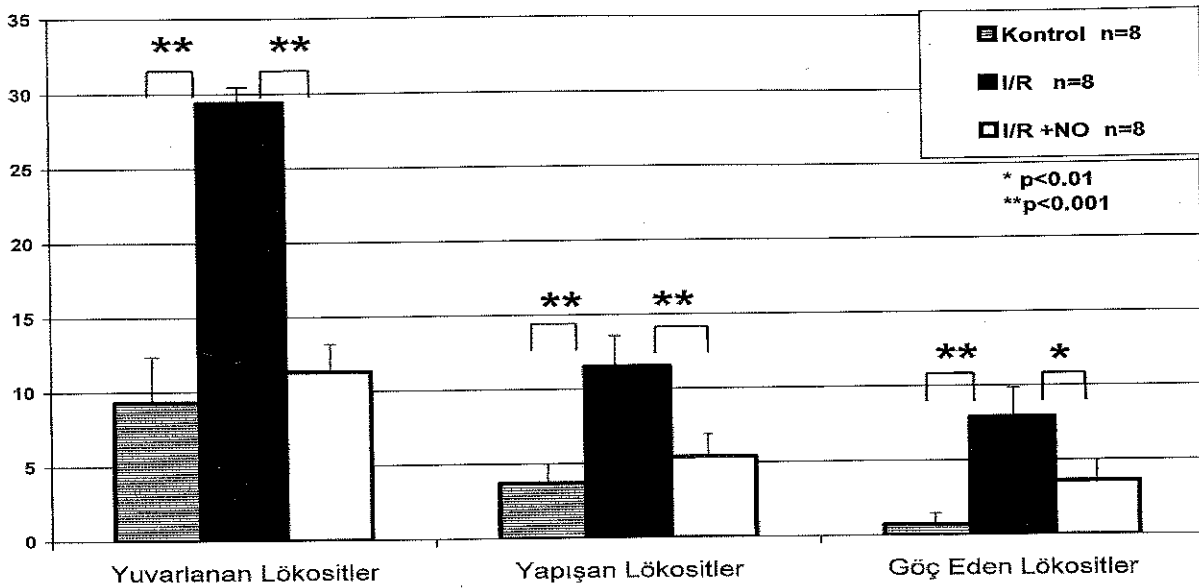
inorganik ve organik NO donörleri ile ve NO sentezi için bir amino asit substratı olan L-Arginin ile bir çok yerine koyma stratejileri denenmiştir. Reperfüzyonu takiben ilk 30 dakika içinde venüler endotelyuma lökosit yuvarlanma ve yapışmasında hızlı bir artışa neden olduğunu, NO donörü infüzyonu ile venüler endotelium üzerinde postreperfüzyon lökosit yuvarlanma ve yapışmasının belirgin şekilde düşürüldüğünü göstermişlerdir. Bu çalışmalardan, iskemi-reperfüzyon injurisinde NO'in herhangi bir formda yerine konulması reperfüzyon yaralanmasına karşı bir koruma temin eder sonucu çıkarılmıştır.¹³⁻¹⁵

McCall¹⁶ ve arkadaşları NO'in rat nötrofil agregasyonunu inhibe ettiğini, Kubes⁵ NO sentez inhibitörü süperfüzyonunun kedi mezenterik mikrovasküler yatağında venüler endotelyuma lökosit yapışmasında belirgin bir düşüşe neden olduğunu göstermişlerdir.

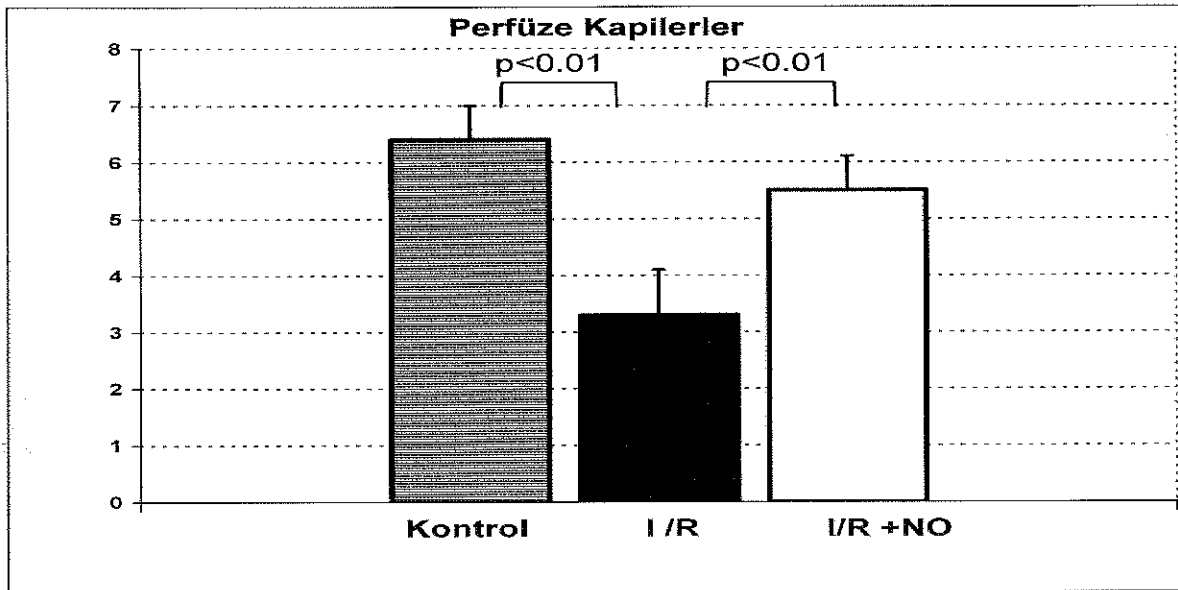
Kültüre aort endotel hücreleri kullanılarak yapılan bir çalışmada; NO donörleri veya NO prekürsörü L-argininin bazal ICAM-1 yüzey oluşumunu azalttığı bulunmuştur.¹⁷ Bu NO donörü aynı zamanda venüler endotelium yüzeyinde P-selektin yüzey oluşumunu engellemiştir.

Tavşanlarda tenuissimus kas flebi üzerinde I/R olmaksızın yapılan bir çalışmada, topikal olarak kullanılan L-Argininden kaynaklanan endojen NO'in, arteriol ve venül çaplarını artırdığı intravital olarak gözlemlenmiştir.¹⁸ Bu çalışmada, ayrıntılı olarak rapor edilmese de, yine bir NO prekürsörü olan L-N^G-monomethylarginine (L-NMMA) kullanımının trombosit ve lökosit agregatlarına neden olduğu, bu etkinin D-N^G-monomethylarginine (D-NMMA) kullanımında görülmediği bildirilmiştir.

Ratlarda deri flebi¹⁹, domuzlarda myokutan flep²⁰ kullanılarak yapılan çalışmalarda reperfüzyon öncesi ve sonrası NO prekürsörü olan L-arginin kullanımının, I/R yaralanması etkilerini azalttığı saptanmıştır. Bu



Şekil 3: I/R yaralanması yuvarlanan, yapışan ve göçeden lökositlerin sayısında anlamlı yükselişe neden olmuş, NO grubunda anlamlı düşüş kaydedilmiştir.



Şekil 4: Refüze olabilen kapillerlerin sayısı I/R grubunda anlamlı olarak düşmüşken, NO uygulanması flep mikrosirkülasyonunda anlamlı yükseliş sağlamıştır.

çalışmalarda parametre olarak flepteki nekroz miktarı, MPO aktivitesi ve lökosit sayısı almış ve NO'in nötrofil adezyonunun inhibe edebileceği bulunmuştur.

Literatürdeki çalışmalarda daha ziyade endotelial disfonksiyona bağlı endojen NO salınımındaki azalma ve NO'in endotel yüzeyindeki yapışma moleküllerine etkisi üzerinde durulmuştur. Verilen NO genellikle endotelial NO salınımını azalmayı replase etmek üzere

iskemik vasküler yatağın endoteli ile temas edecek şekilde uygulanmıştır. Oysa bu çalışmada NO donörü reperfüzyondan önce mikro-vasküler klemp alınmadan venöz sisteme verildiği için, iskemik vasküler yatağın endoteli ile direk teması önlenmiş ve sadece, reperfüzyonla beraber iskemik vasküler yatağa ulaşacak olan lökositlerin NO ile teması sağlanmıştır. Bu bize NO'in lökositler üzerindeki yapışma reseptörlerinin

regülasyonunu etkileyerek de yuvarlanma ve yapışmayı önleyebileceğini düşündürmüştür. Bu bulgumuz literatürdeki Lopez-Neblina¹⁵ ve arkadaşlarının çalışması ile uyumludur. NO donörünü reperfüzyondan 20 dakika önce vermemizin nedeni; çeşitli redoks formları olan ve bu formlara göre reperfüzyonun oluşturduğu erken oksidan stres altında farklı etki gösteren NO'nin, süperoksit radikalleri ile etkileşime girip, etkisini kaybederek serbest radikal gibi davranmasını önlemektir. Bu çalışmada da 20 dakika önce verilen NO istenilen etkiyi oluşturmuştur.

SONUÇ

NO donörlerinin lökosit-endoel hücreleri arasında etkileşimlerine etkisi bir çok organ ve doku modellerinde çalışılmış olmakla beraber, bu etkiyi iskemi-reperfüzyon yaralanmasında, bir kas flebi modelinde mikrosirkülasyon seviyesinde intravital olarak ilk defa bu çalışmamızla gösterdik. Reperfüzyondan 20 dakika önce sistemik olarak verilen bir NO donörü ile postkapiler venüllerde yuvarlanan, yapışan ve göçeden lökosit miktarlarında iskemik kontrol grubuna göre anlamlı düşüş, ana arteriol çapında ve perfüze kapiler miktarında anlamlı yükseliş elde ettik. Bu bize NO'nin lökosit-endoel yapışma etkileşimlerini engelleyerek kas fleplerinde, iskemi/ reperfüzyon yaralanmasının engellenmesi veya etkisinin azaltılmasında faydalı olabileceğini düşündürdü.

*Dr. Murat TÜREGÜN
GATA Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi AD.
Etik 06018 ANKARA*

KAYNAKLAR

- Siemionow, M., Wang, W.Z., Anderson, G., Firrell, J.: Leukocyte-Endothelial interaction and capillary perfusion in ischemia/reperfusion of the rat cremaster muscle. *Microcirc. Endoth. Lymphatics*, 7:183, 1991.
- Formigli, L., Lombardo, L.D., Adembri, C., Brunelleschi, S., et al: Neutrophils as mediators of human skeletal muscle ischemia-reperfusion syndrome. *Hum Pathol* 23:627, 1992
- Lawrence, M.B., Springer, T.A.: Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65:859, 1991.
- Albelda, S.M., Smith, C.W., Ward, P.A.: Adhesion molecules and inflammatory injury. *FASEB J* 8:504, 1994
- Kubes, P., Suzuki, M., Granger, D.N.: Nitric Oxide: An Endogenous Modulator of Leukocyte Adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 88:4651, 1991.
- Abdih, H., Kelly, C., Bouchier-Hayes, D., Watson, W.G., Redmond, H.P., Burke, P., Bouchier-Hayes, D.J.: Nitric Oxide (Endothelium-Derived Relaxing Factor) Attenuates Revascularization-Induced Lung Injury. *J. Surg. Res.*, 57:39, 1994.
- Lefter, A.M., Lefter, D.J.: The Role of Nitric Oxide and Cell Adhesion Molecules on the Microcirculation in Ischemia-Reperfusion (Review). *Cardiovascular Research*, 32: 743, 1996.
- Messmer, K., Sack, F.U., Menger, M.D.: White cell-endothelium interaction during postischemic perfusion of skin skeletal muscle. *Adv. Exp. Med. Biol.* 242:95, 1988
- Zamboni, W.A., Roth, A.C., Russell, R.C., Graham, B., Suchy, H., Kucan, J.O.: Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg* 91:1110, 1993
- Carden, D.L., Smith, J.K., Korthuis, R.J.: Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle: Role of granulocyte adherence. *Circ. Res.* 66:1436, 1990
- Shaheen, K.W., Punch, J.D., Rees, R.S.: Early role for neutrophils in skin flap failure. *Surg. Forum* 41:553, 1990
- Lefter, A.M., Tsao, P.S., Lefter, D.J., Ma, X.L.: Role of Endothelial Dysfunction in Pathogenesis of Reperfusion Injury Following Myocardial Ischemia. *FASEB J.*, 5:2029, 1991.
- Lopez-Neblina, F., Paez, A.J., Toledo, A.H., Toledo-Pereyra, L.H.: Role of Nitric Oxide in Renal Ischemia/Reperfusion in the Rat. *Circ. Shock*, 44:91, 1994.
- Lopez-Neblina, F., Paez, A.J., Toledo-Pereyra, L.H.: Modulation of Neutrophil Infiltration Through Nitric Oxide in the Ischemic Rat Kidney. *Transplant. Proc.*, 27:1883, 1995.
- Lopez-Neblina, F., Toledo-Pereyra, L.H., Mırmıran, R., Paez-Rollıys, A.J.: Time Dependence of Na-Nitropruside Administration in the Prevention of Neutrophil Infiltration in the Rat Ischemic Kidney. *Transplantation*, 61:179, 1996.
- McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M.J., Whittle, B.J.R., Moncada, S.: Synthesis of Nitric Oxide from L-Arginine by Neutrophils. *Biochem. J.*, 261:293, 1989
- Jerome, S.N., Doré, M., Paulson, J.C., Smith, C.W., Korthuis, R.J.: P-selectin and ICAM-1-dependent Adherence Reactions: Role in the Genesis of Postischemic No-Reflow. *Am. J. Physiol.*, 266: H1316, 1994.
- Persson, M.G., Gustafsson, L.E., Wiklund, N.P., Hedqvist, P., Moncada, S.: Endogenous nitric oxide as a modulator of rabbit skeletal muscle microcirculation in vivo. *Br J Pharmacol.* 100:463, 1990
- Corderio, P.G., Mastrakos, D.P., Hu, Q.Y.: The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 100:1227, 1997
- Corderio, P.G., Santamaria, M.D., Hu, Q.Y.: Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 102:2040, 1998

An Alternative Treatment for the Split Skin-Graft Donor Site

Valerie J. Ablaza, M.D., Anthony C., Berlet, M.D., and Mark E. Manstein, M.D. New York, NJ, USA (V.J.A.) Newark, NJ, USA (A.C.B.), Philadelphia, PA, USA (M.E.M)
(*Aesth. Plast. Surg.* 21:207-209,1997.)

There are a variety of methods employed in the post-operative management of the artil thickness donor site created during harvest of a split thickness skin graft. Each technique may be associated with potential complications of fluid loss, excessive pain, prolonged period for healing and delayed mobility, hypertrophic scarring, undersirable pigment aesthetics, and thin skin poorly resistant to everyday trauma. Thompson, and Converse and Robb-Smith have previously shown improved donor site outcome with the application of thin split skin grafts. Based on these studies, we present a technique that involves 1.5:1 meshing of a split skin graft and dividing it into equal halves so that one haf is used to cover the defect and the other half is immediately returned to the donor site. Patients who are elderly, debilitated, or who have thin, poor-quality skin can expect less discomfort, reduction of fluid loss, improved durability and elasticity, and lower incidence of hypertrophic scarring with the proposed donor site regrafting.

Wineglass Pattern for Vertical Mammoplasty

Fethi Orak, M.D., Akın Yücel, M.D., and Cemal Şenyuva, M.D.
(*Ann Plast. Surg.* 21:180-186,1997)

The ideal reduction mammoplasty technique should create a pleasing breast shape with minimal scarring. The long and conspicuous scar associated with the classic inverted "T" pattern mammoplasty techniques are not acceptable for many patients. Periareolar mammoplasty techniques cause less scarring, but they have major disadvantages such as scar widening, areolar distortion, and insufficient breast projection. we used a new pattern for vertical mammoplasty to overcome the insufficient breast projection caused by the round block technique and applied it to 51 patients during the last 3 years. This method results in a single vertical scar and a periareolar scar, allows sufficient volume reduction, and provides good breast shape and projection; the results are durable. This procedure is safe, causes few complications, and is easy to learn and perform.

Anatomical Study on the Temporal Fascial Layers and Their Relationships with the Facial Nerve

G.L. Campiglio, M.D., Ph.D. and P. Candiani, M.D.
(*Aesth. Plast. Surg.* 21:69-74,1997.)

The recent application of endoscopic techniques in facial rejuvenation has stimulated a new interest in the anatomy of this region. In endoscopic face lift, as in open techniques, one of the main steps is the conjunction of dissections of the upper and midface, without damage to the frontal branch of the facial nerve. This article provides an accurate account of the organization of the temporal fascial layers and their relationship with the facial nerve. The authors' dissections confirm that the frontal branch, despite the variations in branching patterns, has an anatomical relationship with the surrounding fasciae that can be deemed constant and predictable: The frontal branch lies in the deep layer of the fatty tissue interposed between the suprazygomatic extension of the superficial musculoaponeurotic system (SMAS) and the superficial leaflet of the temporal aponeurosis. The arrangement of the temporal fasciae on the zygomatic arch is also discussed.

Involvement of Neutrophils in Ischemic Injury. I. Biochemical and Histopathological Investigation of the Effect of FK506 on Dorsal Skin Flaps in Rats

Oguz Cetinkalc, MD, Remisa Sengul, PhD, Levent Bilgic, MD, Murat Bolayirli, MD, Osman Sencl, MD, Gülden Burcak, PhD.

(*Ann Plast Surg* 1997;39:505-515.)

The purpose of this study was to investigate the role of neutrophils in ischemic tissue injury and the possible inhibition by pretreatment with FK06, a neutrophilic modulating agent. A dorsal caudally based skin flap (3x9cm) was used as an ischemic injury model in experimental groups. Prior to flap elevation, FK506 at doses of 0.3 mg per kilogram (group 2), 0.5 mg per kilogram (group 3), and 1.0 mg per kilogram (group 4) was given for 3 days intramuscularly. The relationship among neutrophil accumulation (histopathologically), myeloperoxidase (MPO) activity, malondialdehyde (MDA) content (biochemically) of the flap tissue, and flap survival were studied. Skin flaps showed reduced necrosis in the FK506-treated groups ($p < 0.08$, $p < 0.0001$,