



Serdar ALTUN<sup>1</sup>  
Aysun YILDIZ ALTUN<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Harpur Devlet Hastanesi,  
Plastik, Rekonstruktif ve  
Estetik Cerrahi Kliniđi,  
Elazığ, TÜRKİYE

<sup>2</sup>Elazığ Eğitim ve Araştırma  
Hastanesi,  
Anesteziyoloji ve Reanimasyon  
Kliniđi,  
Elazığ, TÜRKİYE

Geliş Tarihi : 09.04.2013  
Kabul Tarihi : 01.08.2013

Yazışma Adresi  
Correspondence

Serdar ALTUN  
Harpur Devlet Hastanesi,  
Plastik, Rekonstruktif ve  
Estetik Cerrahi Kliniđi,  
Elazığ-TÜRKİYE

serdaralt@gmail.com

## ARAŞTIRMA

F.Ü.Sağ.Bil.Tıp Derg.  
2013; 27 (3): 111 - 116  
http://www.fusabil.org

### Random Paternli Rat Deri Flebinin Yaşayabilirliğini Arttırmada Botulinum Toksin-A'nın Etkisi: Deneysel Çalışma

**Amaç:** Plastik Cerrahi'de doku defektlerinin onarımında en uygun fonksiyonel ve estetik sonucu elde etmek için sıklıkla flepler kullanılmaktadır ancak flep nekrozu halen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Random paternli fleplerde nekroz distal uçtan başlar ve genellikle nedeni yetersiz kan akımıdır. Deneysel çalışmamızda random paternli flebe Botulinum A enjeksiyonu yaparak flep yaşayabilirliğini artırma hedeflendi.

**Gereç ve Yöntem:** 18 adet wistar cinsi erkek sıçanın sırtından kaudal bazlı 2x8 cm boyutlarında random paternli McFarlane flebi model olarak kullanılarak flepler kaldırıldı. Ratlar rastlantısal olarak 3 gruba ayrıldı. Grup I (kontrol grubu) hiç ilaç uygulanmamıştır, Grup II (Botulinum-A grubu) flep kaldırılmadan 5 gün önce flep içerisine Botulinum-A uygulanmıştır, Grup III (Serum Fizyolojik grubu) flep kaldırılmadan 5 gün önce flep içerisine serum fizyolojik uygulanmıştır. Flep kaldırılıp yerine dikildikten 7 gün sonra tüm gruplar için flep nekroz alanları hesaplandı ve istatistiki olarak analiz edildi. Her gruptaki fleplerin yaşayan ve nekroz olan alanları tek tek hesaplandı.

**Bulgular:** Grup I'deki ratlardan kaldırılan fleplerin yüzey alanının ortalama %55.91±3.68 oranında nekroz olduğu, Grup II'de bu rakamın %30.66±3.7 olduğu ve Grup III' de ise %58.07±4.05 olduğu bulundu. Nekroz alanları açısından Grup I ve III arasında istatistiki fark bulunmayıp, Grup II'deki nekroz alanı diğer gruplardan istatistiki olarak anlamlı düzeyde daha düşük bulundu.

**Sonuç:** Botulinum Toksin-A enjeksiyonunun ortalama nekroz oranını istatistikî olarak anlamlı derecede azalttığı saptanmıştır.

**Anahtar Kelimeler:** Flep yaşayabilirliği, botulinum toksin-A, deneysel.

#### The Effects of Botulinum Toxin-A on Random-Pattern Skin Flap Survival in Rats: An Experimental Study

**Objective:** Flaps are used in order to obtain the most favorable functional and esthetic outcomes in the repair of tissue defects in plastic surgery, however flap necrosis continues to be an important problem. Necrosis begins from the distal end in random pattern flaps and is usually caused by inadequate blood flow. In this experimental study, we aimed to increase flap viability by injecting botulinum A to random pattern flaps.

**Materials and Methods:** Flaps were removed using the caudal base random pattern McFarlane flap model measuring 2x8 cm which was harvested from the dorsum of 18 wistar male rats. The rats were randomly divided to three groups. Group I (control group) was not administered with any drugs, Group II (Botulinum A group) was administered Botulinum-A in the flap 5 days before flap removal and Group III (saline group) was administered saline in the flap 5 days before flap removal. The areas of flap necrosis were calculated for all groups 7 days after flap removal and placement suturing and data were statistically analyzed. The viable and necrotic areas of the flaps in all groups were individually

**Results:** The average necrotic area was 55.91±3.68%, 30.66±3.7% and 58.07±4.05% in Group I, Group II and Group III, respectively. There was no statistically significant difference found between Group I and III in terms of necrosis areas whereas the necrosis area was found to be significantly statistically different in Group II.

**Conclusion:** Botulinum A toxin injection was found to significantly reduce the area of necrosis.

**Key Words:** Flap Viability, botulinum toxin-A, experimental.

#### Giriş

Deri flebi; deri ve subkutan dokudan ibaret olan ve vücudun bir yerinden başka bir yerine, kan damarları veya vücutla olan bağlantılarından ayrılmadan taşınan doku parçasıdır (1). Plastik Cerrahi'de doku defektlerinin rekonstruksiyonunda en uygun fonksiyonel ve estetik sonucu elde etmek için sıklıkla flepler kullanılmaktadır. Plastik cerrahi açısından flepde gelişen nekroz halen önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Random paternli fleplerde nekroz distal uçtan başlar ve genellikle nedeni yetersiz kan akımıdır. Bu tür fleplerde, flep uzunluğunu artırma ihtiyacı çeşitli farmakolojik ajanların kullanılmasını veya cerrahi geciktirme işlemini gerektirmektedir (2, 3).

Flep nekrozunu azaltmak için birçok ilaç kullanılmıştır. Bu ilaçlar: sempatotikler, direk vazodilatörler, kalsiyum kanal blokörleri, fosfodiesteraz inhibitörleri, kanın fiziksel özelliklerini değiştiren ajanlar, eikozanoidler ve bunların sentez inhibitörleri, serbest radikal giderici (antioksidan) ajanlardır (2, 4).

Botulinum toksin-A (BTX-A), sempatik sinir liflerinin uyarımı için gerekli olan asetilkolin ve nörepinefrinin presnaptik kavşaktan salınımını bloke ederek hedef dokuda denervasyon ve kimyasal sempatektomiye neden olurlar. Bu iki etki mekanizması ile damar düzkasında gevşeme ve damarda vasodilatasyona neden olur (5). Sempatik vazokonstriksiyon alfa reseptörleri üzerinden kaynaklanmaktadır. Alfa reseptörlerinin sinyal iletiminde ise fosfolipaz D aktivitesi önemli rol oynamaktadır. Botulinum toksininin fosfolipaz D aktivitesini azaltarak da sempatektomiye sebep olmaktadır (6). Daha önce yapılan deneysel çalışmalarda BTX-A'nın anastomoz yapılan damarlarda trombozu önlediği ve damarda vazodilatasyon yaptığı ve kaldırılan ada flebinde pedikülün etrafına yapılmasının flep viabilitesini artırdığı gösterilmiştir (7).

Çalışmamızda deneysel olarak sıçanlarda standart nekroz oranına sahip flep modeli oluşturmayı ve oluşturduğumuz flep modelinde BTX-A enjeksiyonunun flep yaşayabilirliği üzerine etkisini klinik ve istatistiksel olarak araştırmayı amaçladık.

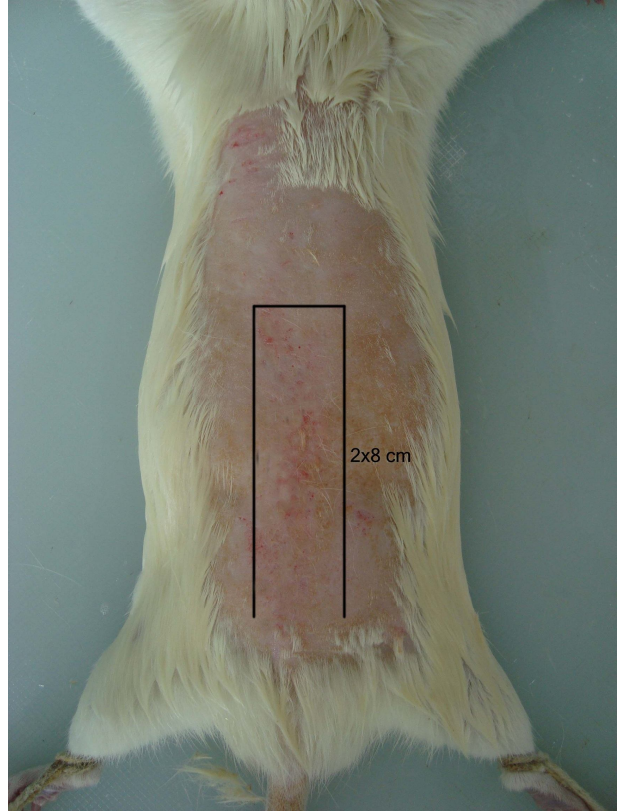
## Gereç ve Yöntem

Çalışmamızda 240–260 gram ağırlığında, Wistar albino cinsi, 18 adet erkek rat kullanıldı. Çalışma süresince tüm ratlar aynı odada tutuldu ve aynı yemlerle beslendi.

Ratlara cerrahi uygulama yapmak için 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar® flakon, Eczacıbaşı) ve 5 mg/kg xylazin hydrochlorid (Rompun® flakon, Bayer) intraperitoneal olarak verilerek anestezileri sağlandı. Ratların sırtlarında random fleplerin kaldırılacağı bölgedeki kıllar tıraş edildi. Denekler yüzükoyun pozisyonunda yere yatırıldı. Cerrahi saha polivinylpyrrolidone solüsyon (Batticon® solüsyon Adeka) ile dezenfekte edildi. Bütün gruplarda cerrahi işaretleme kalemi kullanılarak ratların sırtlarında alt sınırı iliak crest hizasında olacak biçimde, kaudal pediküllü dikdörtgen şeklinde ve 2x8 cm boyutlarında random fleplerin çizimi yapıldı (Şekil 1). BTX-A (Botox®-Allergan; Irvine, Calif.)'nın 100 ünitelik flakonlarına 5 cc %0.09'luk NaCl eklendi ve her bir 0.1 cc'de 2 ünite BTX-A elde edildi.

Ratlar her grupta n=6 olacak şekilde 3 gruba ayrıldı

Grup I: Kontrol grubu olarak çalışmaya alındı, bu gruptaki ratların sırtından kaudal bazlı 2x8 cm boyutlarında random paternli flepler kaldırıldı ve tekrar yerine dikildi (Şekil 2).



Şekil 1. Flep kaldırılması planlanan alanın temsili görüntüsü.

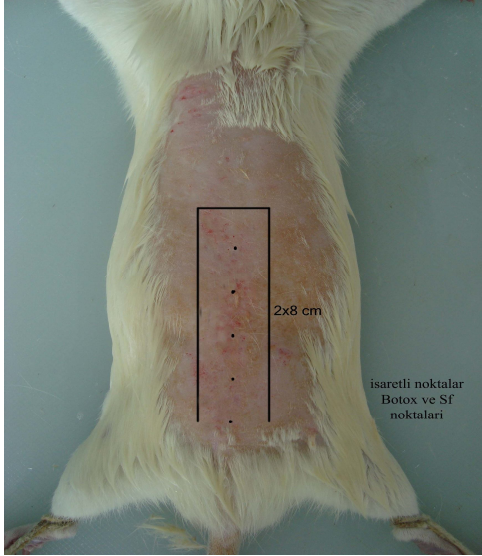


Şekil 2. Kaudal bazlı flebin tamamen kaldırılmış olduğu görülmekte.

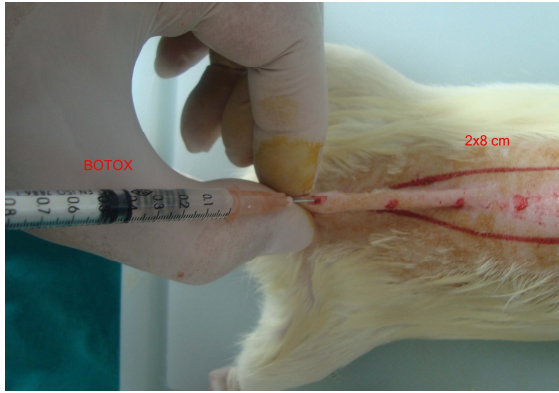
Grup II: İlaç uygulanan grup (Botox® grubu) olarak çalışmaya alındı, bu gruptaki ratların sırtında kaldırılacak olan kaudal bazlı flep (2x8 cm boyutlarında) cerrahi kalem ile çizildikten sonra flep bazisinden distale doğru 1.5 cm arayla intradermal olarak toplamda 0.5 cc Botox® (10 ünite) enjeksiyonu yapıldı (şekil 3-4). Beş gün beklemeden sonra flepler kaldırıldı ve tekrar yerine dikildi.

Grup III: %0.09 NaCl grubu olarak çalışmaya alındı. Bu gruptaki ratların sırtında kaldırılacak olan kaudal bazlı flep (2x8 cm boyutlarında) cerrahi kalem ile çizildikten sonra flep bazisinden distale doğru 1.5 cm arayla intradermal olacak şekilde 0.5 cc %0.09 NaCl enjeksiyonu yapıldı (Şekil 3). Beş gün beklemeden sonra flepler kaldırıldı ve tekrar yerine dikildi.

Ameliyatı takip eden 3 gün boyunca günde bir kez polivinylpyrrolidone solüsyon ile cerrahi alanlara pansuman yapıldı. Tüm deneyler süresince deneklerden hiç ölen olmadı. Cerrahi yapılan alanlarda enfeksiyon gözlenmedi.



**Şekil 3.** Rat sırtından planlanan flebin ve enjeksiyon noktalarının temsili gösterimi.



**Şekil 4.** Flep kaldırılmadan 5 gün önce yapılan intradermal enjeksiyonun gösterilmesi.

Fleplerin değerlendirilmesi postoperatif 7. günde yapıldı. Değerlendirme yapmak için ratlara 50 mg/kg ketamin hidroklorid (Ketalar® flakon Eczacıbaşı) ve 5 mg/kg xylazin hydrochlorid (Rompun® flakon Bayer) intraperitoneal olarak enjekte edilerek anestezileri sağlandı. Daha sonra her bir rata 0.5 mL fluorescein sodyum (Fluorescite® ampül, %10, Alcon) intraperitoneal olarak enjekte edildi. Flepler 20 dakika sonra wood lambası altında, fluoresceinin floresansı ile değerlendirildi. Asetatlı kâğıt üzerine fleplerin yaşayan ve nekroz olan kısımları işaretlendi ve alanları hesaplandı.

Verilerin değerlendirilmesi SPSS 21.0 programında yapıldı. Gruplar arasında canlı kalan flep alanı, tüm flep alanına olan oran ortalamaları yönünden farkın anlamlılığı, Kruskal Wallis testiyle değerlendirildi. Yapılan

değerlendirmelerde  $P < 0.05$  için sonuçlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

### Bulgular

Toplam 3 grup halinde çalışmaya alınan ratların sırtlarından kaldırılan random fleplerin yaşayan ve nekroza giden alanlarının hesaplanması, şeffaf asetat kâğıdı üzerine flep boyutu ve nekroz olan alanlar kopyalandıktan sonra bu asetat kâğıdının milimetrik kâğıt üzerine yerleştirilmesi ile hesaplanmıştır. Yaşayan ve nekroz olan flep alanı  $\text{cm}^2$  olarak hesaplandı (Tablo 1'de klinik değerlendirme sonuçları görülmektedir).

**Tablo 1.** Üç farklı grubun klinik değerlendirme sonuçları

Gruplar		Yaşayan alan ( $\text{cm}^2$ )	Nekroze alan ( $\text{cm}^2$ )	Yaşayan alan (%)	Nekroze alan (%)
Grup I (Kontrol)	1	3.02	11.52	20.77	79.23
	2	7.52	8.04	48.32	51.68
	3	5.98	8.72	40.68	59.32
	4	7.32	7.68	48.80	51.20
	5	7.78	6.57	54.21	45.79
	6	7.76	7.23	51.76	48.24
Grup II (BTX-A)	1	11.78	3.01	79.64	20.36
	2	11.14	4.24	72.43	27.57
	3	7.66	7.54	50.32	49.68
	4	9.60	5.35	64.21	35.79
	5	11.92	3.21	78.78	21.22
	6	10.93	4.53	70.69	29.31
Grup III (%0.9 NaCl)	1	4.02	10.65	27.40	72.60
	2	5.16	9.57	35.03	64.97
	3	6.42	9.32	40.78	59.22
	4	7.15	7.65	48.31	51.69
	5	7.12	8.25	46.51	53.49
	6	7.02	6.08	53.58	46.42

Kontrol grubunda nekroze olan flep alanları %45.79 ile %79.23 arasında değişmekteydi ve ortalama nekroz alanı % 55.91, ortalama canlı alan %44.09 olarak tespit edildi (Şekil 5).



**Şekil 5.** Flebin distalinin yaklaşık %50'sinden fazlasının nekroz olduğu görülmekte.

Grup II'de (BTX-A) nekroze olan flep alanları %20.36 ile %49.68 arasında değişmekteydi ve ortalama nekroz alanı %30.66, ortalama canlı alan %69.35 olarak tespit edildi (Şekil 6).

Grup III'de (%0.9 NaCl) nekroze olan flep alanları %46.42 ile %72.60 arasında değişmekteydi ve ortalama nekroz alanı %58.07, ortalama canlı alan %41.94 olarak tespit edildi (Şekil 7-8).



Şekil 6. Flebin distalinde minimal nekroz görülmekte.



Şekil 7. Flebin distalinin yaklaşık % 50'sinden fazlasının nekroz olduğu görülmekte.



Şekil 8. Grupların birarada görüntüsü.

İstatistiki olarak gruplar arasında yaşayan ve nekroza uğrayan flep alanları değerlendirildiğinde; Grup II'de Grup I ve Grup III'e oranla yaşayan alan yüzdesi istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu. Nekroza uğrayan flep alanları değerlendirildiğinde Grup II'de Grup I ve Grup III'e oranla anlamlı düzeyde düşük bulundu. Yaşayan ve nekroza uğrayan flep alanları açısından Grup I ve Grup III arasında anlamlı düzeyde bir fark bulunulmadı (Tablo 2).

Tablo 2. Grupların istatistiksel karşılaştırılması

Gruplar	Yaşayan alan (cm <sup>2</sup> )	Yaşayan alan (%)	Nekroz alan (cm <sup>2</sup> )	Nekroz alan (%)
Kontrol (n=6)	6.56±0.55	44.09±3.68	8.29±0.51	55.91±3.68
Botox (n=6)	10.50±0.54 <sup>*</sup> (p=0.004)	69.35±3.7 <sup>*</sup> (p=0.007)	4.65±0.50 <sup>*</sup> (p=0.004)	30.66±3.7 <sup>*</sup> (p=0.007)
Serum Fizyolojik (n=6)	6.14±0.60	41.94±4.05	8.59±0.53	58.07±4.05

## Tartışma

Random deri flepleri, teknik olarak basit olmasından dolayı cilt defekterinin örtülmesinde yaygın olarak kullanılmaktadır. Ancak, bu fleplerin damarlanmasının tahmin edilememesinden dolayı bazen flebin distal bölümünde parsiyel flep nekrozu ile karşılaşılmaktadır. Bir komplikasyon olarak karşılaşılan flep nekrozları ek cerrahi girişimlere, hastanede kalış süresinde uzamaya ve tedavi masraflarının artışına neden olmaktadır. Bundan dolayı, random deri flep distalinin yaşayabilirliğini artırmak klinik olarak önemli bir hedefdir (8).

Flep nekrozlarının önlenmesine yönelik olarak yapılan deneysel çalışmalarda McFarlane ve arkadaşlarının 1965 yılında tanımladığı flep modeli kullanılmaktadır (9). Deneysel çalışmalarda kullanılan fleplerin boyutları farklı ölçülerde planlanıp modifiye McFarlane tekniği olarak kullanılmaktadır. Bu çalışmada 2x8 cm boyutu kullanılmıştır. Bu flep ve bu boyutlar seçildiğinde normalde flebin yarısından fazlası nekroz olmaktadır. Bu yüzden flep yaşamının artırılması için yapılan çalışmalarda ideal bir model olmaktadır (10).

Litaratürle uyumlu olarak kontrol grubunda da kaldırılan fleplerin yarısı veya yarısından fazlası nekroz oldu.

Flep dolaşım fiziolojisindeki en önemli etken, nöronal ve humoral faktörler tarafından kontrol edilen derideki kan akımıdır. Bu iki etken içerisinde nöronal faktörler daha önemli bir rol oynar. Nöronal sistem; sempatik adrenarjik vazokonstriktör sistem ve sempatik non adrenarjik vazodilatatör sistem tarafından kontrol edilir. Humoral sistem içerisinde vazokonstriktör etkili epinefrin, norepinefrin, serotonin, tromboksan ve Prostoglandin F2 $\alpha$  yer alırken vazodilatatör olarak da Prostoglandin E1, prostoglandin I2, histamin, bradikinin, nitrik oksit, lökotrien C4 ile lökotrien D4 yer almaktadır (2).

Deri flebinin distal parçasının beslenmesi tamamen proksimalden gelen kan akımına bağımlıdır. Flep tabanından flep distaline doğru gidildikçe iskemiyin düzeyi giderek artar (11). Kerrigan 1983 yılında deri fleplerinin yaşayabilirliğini belirleyen esas faktörün arteriyel yetmezliğin sebep olduğu iske mi olduğunu söylemiştir (12). Flep distalinin yaşayabilirliği, flep kaldırıldıktan sonraki kritik ilk 12 saat esnasında yeterli kan akımına bağımlıdır. Flep kaldırıldıktan hemen sonra vazokonstriksiyon olmaktadır, bu muhtemelen adrenalin ve noradrenalin nedeniyle, belki de TXA<sub>2</sub> ve Prostaglandin F2 $\alpha$  gibi araşidonik asit türevlerinden olmaktadır (8). Flep elevasyonu esnasında damarların kesilmesi perfüzyon azalmasına neden olur. Flebin kenarları ve çevresi kesilirken vasküler endotelde meydana gelen mekanik hasar intravasküler tromboz oluşumunu artırır. Hasara uğramış endotel trombositlerin agregasyonuna ve intravasküler tromboz oluşumuna yol açmaktadır. Bu olaylar sonuçta flep nekrozuna yol açabilmektedir.

Pearl ve Johnson (13) 1983 yılında başlangıçtaki hiperadrenerjik durumun kapiller yatakta geçici olarak kan akımında durmaya yol açtığını, devamında vazodilatasyon ve reperfüzyon olduğunu göstermiştir. Flepteki iske mi nedeniyle hücrelerde oluşan anaerobik metabolizma sonucunda hücre içinde serbest radikaller artmaktadır. Bundan dolayı random fleplerde iskemik olayların toksik oksijen radikallerinden kaynaklanan iske mi-reperfüzyon hasarına neden olabileceği dikkate alınmalıdır. Serbest oksijen radikalleri ve nötrofil lökositlerin artışı doku hasarında önemli rol oynar, sonuçta tam veya parsiyel flep nekrozuna yol açabilirler (8).

BTX-A hücre membranı üzerinde bulunan SNARE proteinlerine bağlanarak etki göstermektedir. Bu çalışmada kullandığımız BTX-A preparatı ise bir SNARE proteini olan SNAP-25'e bağlanır ve nöromuskuler

bileşkede asetilkolin salınımını bloke eder. Asetilkolin salınımının blokajı, motor nöronlarda ve çizgili kasta geçici felç etkisi yaratmaktadır. Nöromuskuler bileşkedeki bu etkinliğinin öğrenilmesi sonucu toksin birçok alanda tedavi amacıyla kullanılmaktadır (14). Toksin ayrıca parasempatik ve postganglionik kolinerjik liflerden de asetilkolin salınımını inhibe eder. Bu etkinliği enjeksiyondan 3-4 gün sonra başlar. Bu etki mekanizması ise düz kasların aşırı çalıştığı akalazyaya ve hiperhidrozis gibi durumlarda tedavi amacıyla kullanımı olanaklı kılar (15). Postsnaptik sinir hücresinden nöradrenalin deşarjıyla etki gösteren sempatik sinir liflerinin uyarılması için presnaptik kolinerjik liflerden asetilkolin deşarjının olması gerekir, BTX-A bu etkiyi bloke ederek kimyasal sempatektomiye neden olur (6).

Sempatik vazokonstriksiyon bilindiği gibi alfa reseptörleri üzerinden kaynaklanmaktadır. Alfa reseptörlerinin sinyal iletiminde ise fosfolipaz D aktivitesi önemli rol oynamaktadır. Botulinum toksininin fosfolipaz D aktivitesini azalttığı bilinmektedir (6). 2007 yılında Van Beek ve ark. (14) aynı zamanda Reynaud fenomeni de bulunan bir hastaya palmar hiperhidrozis tedavisi nedeniyle BTX-A uyguladılar ve hastanın 3 ay içinde Reynaud fenomeninden kaynaklanan ağrısının azaldığını ve ülserasyonların düzeldiğini gördüler. Bunun üzerine 11 hastaya tedavi amacıyla BTX-A uyguladılar. Vazospazm ve siyanoz sıklığında azalma ve ülserasyonlarda gerileme kaydedtiler. Bu etkininin alfa reseptörler üzerinden gösterdiklerini tespit ettiler.

Botulinum toksininin, otonom sistem üzerinden sempatik vazokonstriktör etkiyi azaltılması prensibine dayanan çalışmalar sonucunda biz botulinum toksinini random paternli fleplerde kullandık ve flep sağ kalımlarına olan etkisini inceledik. BTX-A'nın nöral blok etkisi enjeksiyondan yaklaşık 3-4 gün sonra tam olarak başladığı için, ilaç enjekte edilen grubun (grup II) flebi enjeksiyondan 5 gün sonra kaldırıldı. Grup III ise flepte gözlenen değişikliğin serum fiziyo lojiğ in hidrostatik dilatasyon etkisine bağlı olup olmadığını anlamak için çalışmaya dâhil edilmiştir ve serum fiziyo lojik enjeksiyonundan 5 gün sonra flep kaldırılmıştır. Kontrol grubu olarak oluşturulan ve herhangi bir farmakolojik ajan uygulanan kontrol grubunda nekroz oranını %55.91, serum fiziyo lojik uyguladığımız grupta %58.07, BTX-A uyguladığımız grupta ise %30.66 olarak hesaplandı. Bu veriler ışığında yapılan istatistikî değerlendirme sonucu BTX-A'nın preoperatif 5 gün önce yapılmasının flep viabilitesine katkıda bulunduğu ortaya çıkmaktadır.

## Kaynaklar

1. Lamberty BGH, Healy C. Flaps: Physiology, principles of design and pitfalls. Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery. In: Cohen M. (Editor). Mastery of Plastic and Reconstructive surgery. 1th edition. Boston: Little, Brown and Company 1994: 56-70.
2. Daniel RK. Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. In: Mc Charty (Editor). Plastic Surgery. Philadelphia: W.B Saunders Company 1990: 275-328.
3. Yildirim AM, Okur İ, Orter Z, et al. Nonsurgical delay of dorsal rat cutaneous flap using botulinum toxin type A. Plast Reconstr Surg. 2008; 122: 53-54.

4. Lineaweaver WC, Lei MP, Mustain W, et al. Vascular Endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Annals of Surgery* 2004; 239: 866-873.
5. Huang W, Foster JA, Rogachefsky AS. Pharmacology of botulinum toxin. *J Am Acad Dermatol* 2000; 43: 249-259.
6. JinsiParimoo A, Deth RC. Reconstitution of alpha2D adrenergic receptor coupling to phospholipase D in a PC12 cell lysate. *J Biol Chem* 1997; 272: 14556-14561.
7. Arnold PB, Merritt W, Rodeheaver GT, et al. Effects of perivascular Botulinum Toxin-A application on vascular smooth muscle and flap viability in the rat. *Ann Plast Surg* 2009; 62: 463-467.
8. Shalom A, Westreich M. Effect of High dose and low dose Aspirin on Survival of Random Pattern Flap in Rats. *Scand J Plast Surg Hand Surg* 2001; 35: 117-121.
9. McFarlane Rm, DeYoung G. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and prevention. *Plast Reconstr Surg* 1965; 35: 177-182.
10. Huemer GM, Wechselberger G, Otto-Schoeller A, et al. Improved dorsal random-pattern skin flap survival in rats with a topically applied combination of nonivamide and nicoboxil. *Plast Reconstr Surg* 2003; 111: 1207-1211.
11. Hosnuter M, Babuccu O, Kargı E, et al. Dual preconditioning: Effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg* 2003; 50: 398-402.
12. Kerrigan CL. Skin flap failure: Pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983; 72: 766-777.
13. Pearl RM, Johnson D. The Vascular Supply to the skin. *Annals plastic surg* 1983; 11: 99-105.
14. Van Beek AL, Lim PK, Gear AJ, et al. Management of Vasospastic Disorders with Botulinum Toxin A. *Plast Reconstr Surg* 2007; 119: 217-226.
15. Clemens MW, Higgins JP, Wilgis EF. Prevention of anastomotic thrombosis by botulinum toxin a in an animal model. *Plast Reconstr Surg* 2009; 123: 64-70.