

# Ratlarda Deri Fleplerinin Yaşayabilirliğini Artırmada N-Asetil Sisteinin Etkisi

## Effects of N-Acetyl Cystein on Improvement of Skin Flap Viability in Rats

Alpagan Mustafa YILDIRIM,<sup>a</sup>  
 Mehmet İhsan OKUR,<sup>a</sup>  
 Ali BAL,<sup>b</sup>  
 Necmettin KARASU,<sup>b</sup>  
 Onur GÖKDEMİR,<sup>c</sup>  
 Rafet ÖZBEY<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Plastik Cerrahi AD,  
 Fırat Üniversitesi Tıp Fakültesi, Elazığ,  
<sup>b</sup>Plastik Cerrahi Kliniği,  
 Malatya Devlet Hastanesi, Malatya,  
<sup>c</sup>Plastik Cerrahi Kliniği,  
 Elazığ Devlet Araştırma Hastanesi,  
 Elazığ

Geliş Tarihi/Received: 05.01.2013  
 Kabul Tarihi/Accepted: 26.06.2013

Yazışma Adresi/Correspondence:  
 Ali BAL  
 Malatya Devlet Hastanesi,  
 Plastik Cerrahi Kliniği, Malatya,  
 TÜRKİYE/TURKEY  
 alibal69@hotmail.com

**ÖZET Amaç:** Flep nekrozu yetersiz kan dolaşımı ve iskemi-reperfüzyon hasarının bir sonucu olarak gelişir. Serbest oksijen radikalleri deri doku hasarı oluşumuna katılarak kısmi flep nekrozuna neden olurlar. Bu nedenle çalışmada antioksidan olan N-asetil sistein (NAC)'in, sıçanlarda deri fleplerinin yaşayabilirliği üzerine etkisinin araştırılması amaçlanmıştır. **Gereç ve Yöntemler:** Çalışmadaki deneylerin tümü Fırat Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu'ndan izin alınarak yapıldı. Çalışmada 14 erkek Wistar sıçanı kullanıldı. Bunlar rastgele olarak kontrol grubu ve NAC-grubu olmak üzere yedişerli iki gruba ayrıldı. Her iki gruptaki tüm sıçanlarda dorsal bölgeden 2x7 cm boyutlarında deri flebi kaldırıldı. NAC-grubunun sıçanlarına kas içi olarak günlük sabah akşam 20 mg/kg dozda (günlük total doz: 40 mg/kg), 10 gün süre ile NAC uygulandı. Kontrol grubu sıçanlarına ise 10 gün süre ile aynı zamanlarda diğer gruba verilen NAC solüsyonu hacminde (0,15 mL) %0,9 NaCl solüsyonu kas içi olarak verildi. Operasyon sonrası 10. günde deri flebi canlılığı değerlendirildi. Canlı deri flebi alanının büyüklüğü kontrol grubu ile NAC grubu arasında kıyaslandı. **Bulgular:** Kas içi NAC enjeksiyonu deri flebinin yaşayabilirliğinde kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde artışla sonuçlandı [NAC grubunda deri flep yaşayabilirliği, %59,89 (31,28-66,64); %35,70 (17,25-44,07); p=0,026]. **Sonuç:** Bu çalışmadan elde edilen bulgulara göre, NAC uygulaması deri fleplerinin yaşayabilirliğini önemli derecede arttırmıştır. Bu nedenle NAC uygulamasının flep cerrahisi tedavisini desteklemek için kullanılabilirliği düşünülmektedir.

**Anahtar Kelimeler:** Antioksidanlar; serbest doku flepleri

**ABSTRACT Objective:** Flap necrosis results from inadequate blood perfusion and ischemia-reperfusion injury. Free oxygen radicals play an important role in skin tissue injury, leading to partial flap necrosis. Therefore, in the current study, it was aimed to investigate the effects of N-acetyl cystein (NAC), a highly effective antioxidant agent, on skin flap survival in rats. **Material and Methods:** Fourteen male Wistar rats were randomly divided into two groups of 7 each, control and NAC-groups. A standardized dorsal random pattern (2x7 cm) skin flap was elevated in the rats of both groups. In the rats of NAC group, NAC was administered intramuscularly at a dose of 40 mg/kg body weight/day (20 mg/kg at 8:00 am and 20 mg/kg at 8:00 pm) for 10 days. In the rats of control group, 0.9% NaCl solution was intramuscularly administered for 10 days. Skin flap viability was evaluated on postoperative day 10, and the extent of the viable skin flap area was compared between control and NAC-groups. **Results:** The injection of NAC resulted in a significant increase in skin flap viability when compared to control group [viable skin flap ratio in the NAC-treated group, %59.89 (31.28-66.64); %35.70 (17.25-44.07); p=0.026]. **Conclusion:** In conclusion, our findings suggest that application of NAC might considerably increase flap viability in the distal parts of skin flaps, therefore NAC application might be used to support the treatment in skin flap surgery.

**Key Words:** Antioxidants; free tissue flaps

doi: 10.5336/medsci.2013-33540

Copyright © 2013 by Türkiye Klinikleri

Türkiye Klinikleri J Med Sci 2013;33(5):1288-94

Flep sağkalım oranı, flep dokusunun vaskülarizasyonu ile orantılıdır.<sup>1</sup> Random flepler, baskın besleyici damar sistemine sahip olmadığından; akım, subdermal ve subfasyal pleksuslar yoluyla gerçekleşir.<sup>1-3</sup> Deri kan dolaşımı, lokal ve sistemik faktörler tarafından düzenlenir. Bunlar nörojenik, hümorale, metabolik ve fiziksel faktörler şeklinde sıralanabilir.<sup>1</sup> Flep kan akımını etkileyen faktörler ise deri kan dolaşımını etkileyen faktörlere ilave olarak flebe baskı, flebin gerilmesi, flebin katlanması gibi diğer etkenler sayılabilir.<sup>1-6</sup>

Flep yaşayabilirliğini artırmada cerrahi ve cerrahi olmayan yöntemler kullanılmaktadır. Cerrahide kabul gören yöntem, geciktirme (delay) yöntemidir. Cerrahi olmayan yaklaşımlar arasında ise sempatotikler, vazodilatörler, kalsiyum kanal blokörleri, hemorajik ajanlar, prostaglandin inhibitörleri, antikoagulanlar, glukokortekoidler ve serbest radikal yiyiciler gibi değişik farmakolojik uygulamalar yer almaktadır.<sup>7</sup>

Yapılan anatomik ve farmakolojik çalışmalara rağmen, halen flep nekrozu rekonstrüktif cerrahi için sorun teşkil etmektedir. Flep yaşayabilirliğini artırmada farmakolojik ajanların çoğunun deneysel olarak etkili olduğu belirlenmiş olmasına karşın, değişik nedenlerle rutin tedavi uygulamasına girememişlerdir.<sup>8,9</sup>

Flep cerrahisinde akut fazda iskemi meydana gelir. İskemi sonrası reperfüzyon olan flepte serbest oksijen radikalleri oluşur. Serbest oksijen radikalleri lipid peroksidasyonuna ve hücrel membran harabiyetine neden olurlar, dolayısıyla flep yaşayabilirliğini azaltırlar.<sup>10</sup> Antioksidanlar, serbest radikalleri ve etkilerini azaltarak doku hasarlarını önlerler.<sup>8,9</sup>

N-asetil sistein bir thiol molekül olup, L-sistein ve indirgenmiş glutatyonun prekürsörüdür. N-asetil sistein hücrelerde sülfidril gruplarının kaynağı olup, OH<sup>-</sup> gibi reaktif oksijen radikalleriyle etkileşerek serbest radikalleri temizler.<sup>11,12</sup> Bu nedenle N-asetil sisteinin flep sağ kalırlığı üzerine etkisinin çalışılması amaçlanmıştır.

## GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma Fırat Üniversitesi Deneysel Araştırma Merkezi'nde (FÜDAM) yürütülmüştür. Çalışmada

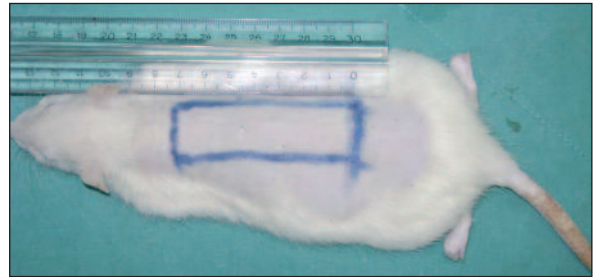
210-270 gram ağırlığındaki 12 haftalık 14 adet Wistar albino cinsi erkek sıçan kullanıldı. Denekler kontrol (n=7) ve N-asetil sistein (NAC) grubu (n=7) olmak üzere iki gruba ayrıldı:

**Kontrol grubu (n=7):** Deneklerden dorsal flep kaldırıldı ve daha sonra orijinal yerine dikildi. Kontrol grubu sıçanlarda on gün süre ile NAC grubundaki gibi aynı zamanlarda diğer gruba verilen NAC solüsyonu hacminde (0,15 mL) %0,9'luk NaCl solüsyonu, intramusküler olarak verildi.

**NAC grubu:** Kontrol grubu gibi deneklerden dorsal flep kaldırıldı ve daha sonra orijinal yerine dikildi. Ayrıca ilk dozu flep kaldırımından 1 saat önce olmak üzere, 12 saat arayla günde 2 kez sabah-akşam olacak şekilde 10 gün boyunca 20 mg/kg dozda (40 mg/kg/gün) intramuskular NAC enjeksiyonu yapıldı.

## CERRAHİ YÖNTEM

Deneklere anestezi yapılmasından sonra, sırt bölgeleri traş edildi. Sterilizasyona uygun olarak sırt bölgesinden frontal tabanlı 2x7 cm, dikdörtgen şekilli deri flebi kaldırıldı (Resim 1, 2). Flep kaldırıldı



**RESİM 1:** Kaldırılması planlanan flep alanının çizilmiş hali. (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



**RESİM 2:** Kaldırılmış 7x2 cm boyutlu random deri flebinin görünüşü. (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

dıktan sonra keskin iğneli 5/0 emilmeyen cerrahi iplik ile, aynı yere eşit mesafelerle atılan dikişler ile adapte edildi (Resim 3). Kanama kontrolü için elektrokoter ya da hemostatik madde kullanılmadı.

### FLEPLERDE NEKROTİK VE YAŞAYAN ALANLARIN ORANLARININ DEĞERLENDİRİLMESİ

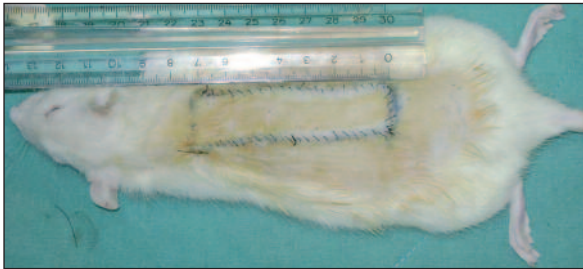
Flep sağkalımının değerlendirilmesi operasyon sonrası 10. günde yapıldı. Deneklere anestezi sonrası fluoressen sodyum enjekte edildi. Flepler 20 dakika sonra wood lambası altında değerlendirildi. Sıçanların sırtlarından kaldırılan fleplerin yaşayan kısımları ile nekroze olan kısımları arasındaki sınır, asetatlı kalemle çizildi. Dijital fotoğraf makinesi ile resimleri çekilerek dijital formatta bilgisayara aktarıldı. Daha sonra Adobe Illustrater CS 11.0.0 grafik programına alınarak, gerekli ölçüm ve hesaplamalar yapıldı (Şekil 1).

### HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME

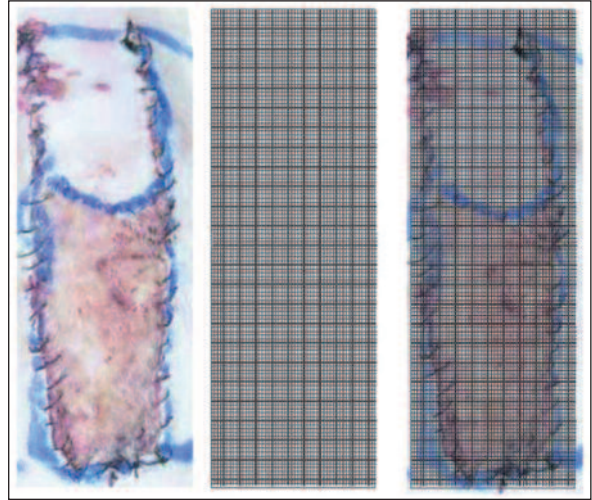
Flepler %10 formol solüsyonu içine alındı ve rutin doku takip işlemlerinden sonra hematoksilin eozin (H&E) boyası ile ışık mikroskopunda değerlendirildi.

### İSTATİSTİKSEL ANALİZ

Bu çalışmada, elde edilen topografik bulgular SPSS bilgisayar programı ile (SPSS Inc, ABD) ortanca (minimum-maksimum) olarak hesaplandı. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro Wilk testi ile yapıldı. Her iki gruptaki fleplerin yaşayan alanlarının karşılaştırılması için Mann-Whitney U testi kullanıldı.  $p < 0,05$  değerleri istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.



**RESİM 3:** Kaldırıldıktan sonra kendi yerine dikilen random flebin görünümü. (Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



**ŞEKİL 1:** Stereolojik yöntemle fleplerin yaşayan ve nekrotik alanların hesaplanması.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

### BULGULAR

Deney süresince sıçan ölümü ve değişik yara enfeksiyonu saptanmadı. Operasyonun 10. gününde kaldırılan fleplerdeki damarlaşma makroskopik olarak incelendiğinde, NAC grubundaki damarlaşmanın kontrol grubuna göre daha belirgin olduğu görüldü (Resim 4).

### KONTROL GRUBUNDAKİ FLEPLERİN YAŞAYAN VE NEKROZ ALANLARI

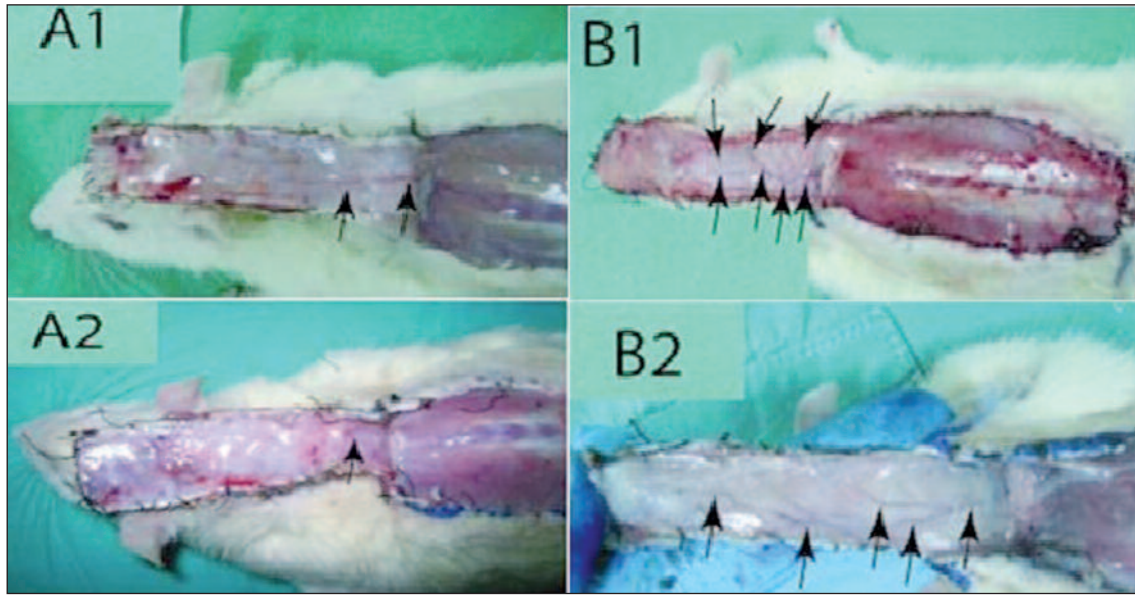
Fleplerin değerlendirilmesinde, yaşayan flep alanlarının toplam flep alanına oranı %35,70 (17,25-44,07) olarak bulundu (Tablo 1).

### N-Asetil Sistein Grubundaki Fleplerin Yaşayan ve Nekroz Alanları

Flepler değerlendirmede yaşayan flep alanlarının, toplam flep alanına oranı %59,89 (31,28-66,64) olarak hesaplandı (Tablo 2).

Kontrol grubunun histolojik incelemesinde (Resim 5) flep proksimalinden distale doğru gidildikçe nekroze giden doku alanın arttığı bulundu.

NAC grubunun H&E ile boyanmış histolojik görüntüleri (Resim 6) incelendiğinde kontrol grubuna göre nekroze gidişin azaldığı dikkati çekmektedir.



**RESİM 4:** Fleplerin 10. gündeki makroskopik görünümü: Kontrol grubu (A1 ve A2) ve NAC grubu sıçanlarda (B1 ve B2).

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

**TABLO 1:** Kontrol grubundaki fleplerin yaşayan ve nekroza alanlarının yüzde oranları.

Kontrol grubu denek numaraları	Fleplerde yaşayan alan (%)	Fleplerde nekroze alan (%)
1	37,80	62,17
2	17,25	82,74
3	25,07	74,93
4	33,33	66,66
5	41,36	58,64
6	35,70	64,29
7	44,07	55,93
Ortanca	35,70	64,29
(Minimum-Maksimum)	(17,25-44,07)	(55,93-82,74)

**TABLO 2:** N-asetil sistein grubundaki fleplerin yaşayan ve nekroza alanlarının yüzde oranları.

N-asetil sistein uygulanmış denek numaraları	Fleplerde yaşayan alan (%)	Fleplerde nekroze alan (%)
1	31,28	68,71
2	40,00	60,00
3	45,99	54,01
4	63,17	36,82
5	59,89	40,11
6	66,64	33,36
7	61,13	38,87
Ortanca	59,89	40,11
(Minimum-Maksimum)	(31,28-66,64)	(33,36-68,71)

## KONTROL GRUBU İLE NAC GRUBUNUN KARŞILAŞTIRILMASI

N-asetilsistein uygulanan gruptaki fleplerin yaşayan alanlarının nekroze alanlara oranı kontrol grubuyla kıyaslandığında fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p=0,026$ ) (Şekil 2).

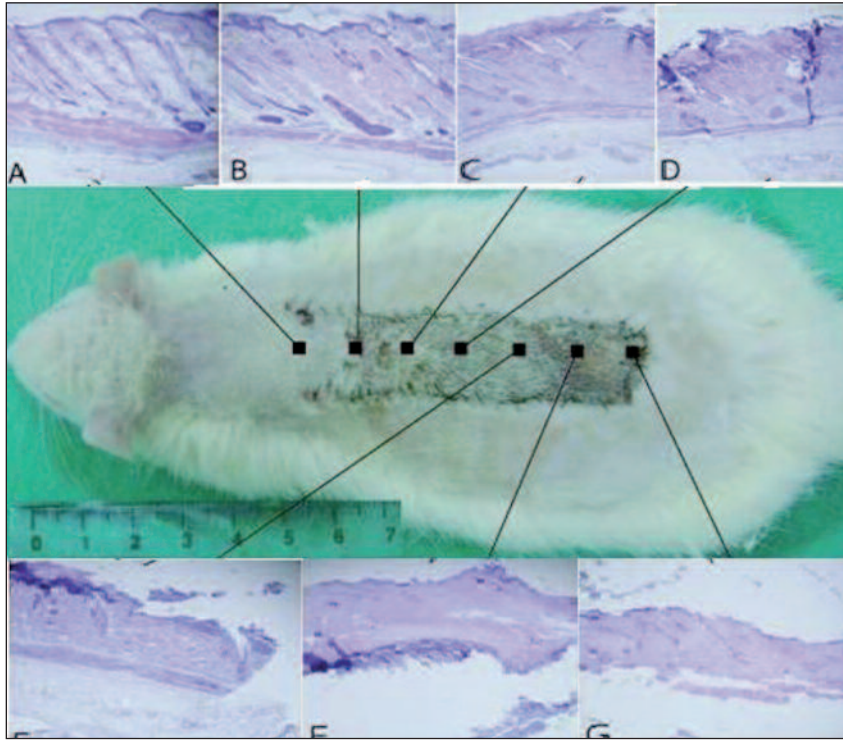
## TARTIŞMA

Çalışmada, Wistar albino cinsi sıçanlarda random deri flep yapıldığı günden başlayarak 12 saat ara ile

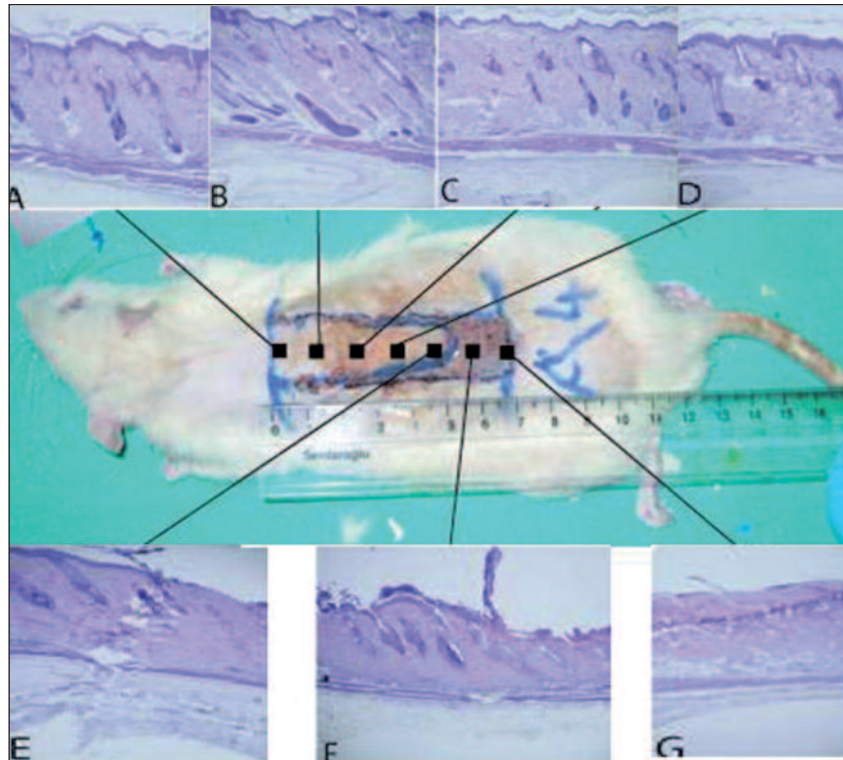
20 mg/kg (40 mg/kg/gün) dozda 10 gün süre ile NAC verilmesinin flep nekrozunu azalttığı gözlenmiştir.

Flep nekrozunu azaltmak için kliniklerde iki aşamalı cerrahi teknikler yerine basit farmakolojik uygulamalar daha pratik olduğu için, çalışmalar kimyasal yöntemlere yoğunlaşmıştır. Fibroblast büyüme faktörü (FGF)-2 ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEGF) gibi bazı anjigenik ajanların tek veya kombine lokal enjeksiyonları, lokal dek-

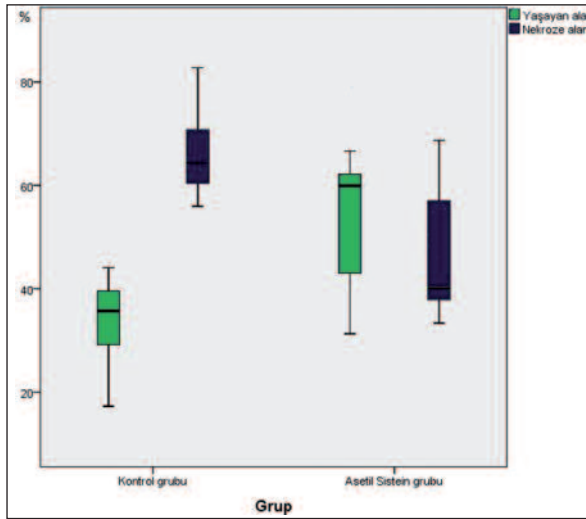




**RESİM 5:** Kontrol grubu bir sıçan flebinin makroskopik ve histolojik görünümü (HE, x100).  
(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



**RESİM 6:** N-asetil sistein grubu bir sıçan flebinin makroskopik ve histolojik görünümü (HE, x100).  
(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)



**ŞEKİL 2:** Kontrol grubu ve NAC grubu sıçan fleplerinin nekroze ve yaşayan alanlarının grafiksel görünümü.

(Renkli hali için Bkz. <http://tipbilimleri.turkiyeklinikleri.com/>)

sametazon enjeksiyonu, nikotin ve kalsiyum kanal blokerlerinin flep yaşayabilirliğini değişen oranlarda artırdığı belirlenmiştir.<sup>13-16</sup>

Serbest oksijen radikallerinin özellikle hücre zarındaki fosfolipidlerle reaksiyona girerek, membran lipidlerinin peroksidasyonuna, hücre membranının parçalanmasına ve hücre ölümüne yol açarak doku nekrozunun patogeneğinde önemli rol oynadığı belirtilmektedir.<sup>17-19</sup> Bu nedenle değişik antioksidan etkili ve lipid peroksidasyonu azaltıcı özelliği olan ajanlardan aminoguanidin, melatonin, askorbat ve tokoferol, ve desferoksaminin flep yaşayabilirliğini anlamlı derecelerde arttırdığı gösterilmiştir.<sup>7,20-22</sup>

Yaptığımız bu çalışmada, antioksidan etkili olan NAC'ın fleplerin nekroze alanlarını %24

oranda ve istatistiksel olarak anlamlı derecede azalttığı tespit edilmiştir (Tablo 1 ve 2). Çalışmamızda NAC'ın flep deri nekrozunu azaltıcı etkisi yukarıda bahsedilen diğer uygulamalarla kıyaslandığında, orta dereceli bir iyileşme (%24 oranda) sağladığı görülmüştür. VEGF uygulamalarına göre doku nekrozunu azaltıcı etkisi düşük kalmış, buna karşın FGF-2 uygulamasına kıyasla daha iyi bir sonuç vermiştir.<sup>15,23</sup> Bununla birlikte antioksidan etkili melatonin uygulaması deri flebi nekrozunu benzer oranda iyileştirmiştir.<sup>21</sup>

Diğer taraftan Abla ve ark.nın asetil sistein ile yapmış olduğu çalışmada asetil sisteinin deri flebi yaşayabilirliğini %14 oranında artırdığı rapor edilmiştir.<sup>11</sup> Çalışmamızın sonuçları Abla ve ark.nın çalışmasını destekler nitelikte olmakla birlikte, yaşayabilirlikteki artış oranı kendi çalışmamızda daha yüksek bulunmuştur. Abla ve ark.nın çalışmasında tek doz uygulamasının flep iskemisi ve reperfüzyon sonucu gelişen oksidatif hasarın yeterli süre baskılanamamasına neden olduğu, ve bunun sonucu olarak da deri flebinde daha fazla nekrozun geliştiği düşünülmektedir.

N-asetil sisteinin hem serbest oksijen radikallerinin oluşumunu azaltarak, hem de glutatyon sentetaz aktivitesini arttırarak antioksidan etki gösterdiği düşünülmektedir.<sup>24</sup> Serbest oksijen radikalleri, flep nekrozunun patofizyolojisinde hem başlangıç, hem de progresyon aşamalarında yer alır.

Sonuç olarak, bu çalışmadan elde edilen bulgular, intramusküler NAC uygulamasının deri fleplerinin yaşayabilirliğini istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdığını ortaya konmuştur. Bu nedenle NAC uygulamasının flep cerrahisi tedavisini desteklemek için kullanılabilirliği düşünülmektedir.

## KAYNAKLAR

- Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flap surgery. In: McCarthy JG, ed. Plastic Surgery. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: WB Saunders; 1990. p.275-328.
- Fisher J, Gingrass MK. Basic principles of skin flaps. In: Georgiade GS, Riefkohl R, Levin LS, eds. Textbook of Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery. 3<sup>rd</sup> ed. Baltimore: Williams and Wilkins; 1997. p.19-28.
- Luce EA. Analysis of complex postextirpative deformity. Clin Plast Surg 1995;22(1):1-8.
- Smith JD, Pribaz JJ. Flaps. In: Achauer BM, Eriksson E, Wilkins EG, Vandekam VM, eds. Plastic Surgery: Indications, Operations and Outcomes. 1<sup>st</sup> ed. St.Louis-Missouri: Mosby; 2000. p.261-90.
- Chang DW, Wang B, Robb GL, Reece GP, Miller MJ, Evans GR, et al. Effect of obesity on flap and donor-site complications in free transverse rectus abdominis myocutaneous flap breast reconstruction. Plast Reconstr Surg 2000;105(5):1640-8.

6. Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg* 1983;72(6):766-77.
7. Karacaoğlan N, Akbaş H. Effect of parenteral pentoxifylline and topical nitroglycerin on skin flap survival. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1999;120(2):272-4.
8. Vedder NB. Flap physiology. In: Mathes SJ, Hentz VR, eds. *Plastic Surgery*. 2<sup>nd</sup> ed. Philadelphia: Sander Elsevier; 2006. p.483-506.
9. Basu TK. Potential role of antioxidant vitamins. In: Basu TK, Temple NJ, Garg ML, eds. *Antioxidants in Human Health and Disease*. 1<sup>st</sup> ed. New York: CABI Publishing; 1999. p.15-7.
10. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985;201(3):357-9.
11. Abla LE, Gomes HC, Percario S, Ferreira LM. Acetylcysteine in random skin flap in rats. *Acta Cir Bras* 2005;20(2):121-3.
12. Jayr C, Matthay MA, Goldstone J, Gold WM, Wiener-Kronish JP. Preoperative and intraoperative factors associated with prolonged mechanical ventilation. A study in patients following major abdominal vascular surgery. *Chest* 1993;103(4):1231-6.
13. Seify H, Bilkay U, Jones G. Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg* 2003; 112(4):1032-9.
14. Fujihara Y, Koyama H, Nishiyama N, Eguchi T, Takato T. Gene transfer of bFGF to recipient bed improves survival of ischemic skin flap. *Br J Plast Surg* 2005;58(4):511-7.
15. Hosnuter M, Babuçcu O, Kargi E, Altinyazar C. Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg* 2003;50(4):398-402.
16. Latifoğlu O, Atabay K, Çelebi C, Çenetoğlu S, Baran NK. [Investigation of effects of nifedipine on the length of viable skin flaps under influence of nicotine]. *Turkish Journal of Plastic Surgery* 1995;3(3):144-51.
17. Roth E, Manhart N, Wessner B. Assessing the antioxidative status in critically ill patients. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 2004;7(2): 161-8.
18. Sanfey H, Bulkley GB, Cameron JL. The role of oxygen-derived free radicals in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Ann Surg* 1984;200(4):405-13.
19. Dabrowski A, Gabrylewicka A, Wereszczyńska-Siemiatkowska U, Chyczewski L. Oxygen-derived free radicals in cerulein-induced acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 1988; 23(10):1245-9.
20. Aydoğan H, Gürlek A, Parlakpınar H, Aydoğan N, Acet A. The protective effect of aminoguanidine on random pattern skin flap survival: an experimental study in rats. *Türkiye Klinikleri J Med Sci* 2007;27(1):36-43.
21. Gurlek A, Aydogan H, Parlakpınar H, Bay-Karabulut A, Celik M, Sezgin N, et al. Protective effect of melatonin on random pattern skin flap necrosis in pinealectomized rat. *J Pineal Res* 2004;36(1):58-63.
22. Eryaman E, Işıksaçan V, Şaroğlu M, Gülanber G, Işıksaçan N. [Free oxygen radicals and flap survival]. *Turkish Archives of Otolaryngology* 1999;37(3):79-83.
23. Zaccogna S, Papa G, Antonini A, Novati F, Moimas S, Carrer A, et al. Improved survival of ischemic cutaneous and musculocutaneous flaps after vascular endothelial growth factor gene transfer using adeno-associated virus vectors. *Am J Pathol* 2005;167(4):981-91.
24. Brown DL, Borschel GH. *Flaps*. Michigan Manuel of Plastic Surgery. 1<sup>st</sup> ed. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins; 2004. p.22-33.