

T.C.

İzmir Katip Çelebi Üniversitesi

Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği

Eğitim Sorumlusu: Doç. Dr. Mübin HOŞNUTER

**İSKEMİ- REPERFÜZYON HASARINA KARŞI  
EPIGALLOCATECHİN GALLATE'NİN (EGCG) KORUYUCU  
ETKİLERİNİN SIÇAN EPİGASTRİK ARTER ADA FLEBİ ÜZERİNDE  
İNCELENMESİ**

**DR. CEM ASLAN**

**UZMANLIK TEZİ**

**2012 – İZMİR**

## ÖNSÖZ

*Uzmanlık eğitimimin son döneminde çalışma imkanı bulduğum bilgi, tecrübe ve cerrahisiyle bana yol gösteren, tez danışmanım ve değerli hocam **Doç. Dr. Mübin Hoşnuter**'e,*

*Her konuda yardımlarını esirgemeyen, uzmanlık eğitimime büyük katkıları olan, **Op. Dr. Meltem Ayhan**'a ve **Op. Dr. Murat Tüzüner**'e,*

*Kendileriyle çalıştığım kısıtlı süre içerisinde bilgi ve deneyimlerinden faydalandığım **Doç. Dr. Ayşe Özlem Karataş Silistreli**'ye, **Doç. Dr. Erhan Sönmez**'e ve **Op. Dr. Önder Karaaslan**'a,*

*Uzmanlık eğitimimin ilk yıllarında çalışma imkanı bulduğum, akademik ve cerrahi özeninden etkilendiğim **Prof. Dr. Metin Görgü**'ye,*

*Aynı klinikte beraber çalışmaktan mutluluk duyduğum **asistan arkadaşlarıma, tüm hemşire ve personel arkadaşlarıma,***

*Her zaman yanımda olan **aileme** ve desteğini benden esirgemeyen **sevgili eşime,***

*Teşekkürlerimi sunarım.*

**Dr. Cem Aslan**

# İÇİNDEKİLER

Önsöz	ii
Simgeler ve Kısaltmalar	iii
<b>1.GİRİŞ</b>	1
<b>2.GENEL BİLGİ</b>	2
2.1 Flep Kan Akımı ve Fizyolojisi	2
2.2 Flep Kaybı	4
2.3 İskemi - Reperfüzyon Hasarı	5
2.4 Tedavi Stratejileri	9
2.4.1 Epigallocatechin Gallate	13
<b>3. GEREÇ ve YÖNTEM</b>	14
3.1 Kullanılan Denekler	15
3.2 Kullanılan Alet ve Malzemeler	15
3.3 Sıçan İnferior Epigastrik Arter Flebinin Hazırlanması	15
3.3.A Anatomi	15
3.3.B Cerrahi Yöntem	16
3.4. EGCG'nin Hazırlanışı	18
3.5. Deney Protokolü ve Deneklerin Gruplandırılması	19
3.5.A. Deney Grupları	19
3.5.B. Kontrol Grupları	20
3.6. Hayvanların Bakımı	21
3.7. Değerlendirmeler	22
3.7.A. Klinik ve Yüzey Alanı (Topografik) Değerlendirmesi	22
3.7.B. Histopatolojik Değerlendirme	23
3.7.C. Biyokimyasal Değerlendirme	24
3.7.D. İstatiksel Değerlendirme	27
<b>4. BULGULAR</b>	27
4.1. Yüzey Alanı Değerlendirme Sonuçları	27
4.2. Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları	29
4.3. Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları	30
4.4. İstatiksel Değerlendirme Sonuçları	31
<b>5. TARTIŞMA ve SONUÇ</b>	41
<b>ÖZET</b>	48
<b>SUMMARY</b>	49
<b>KAYNAKLAR</b>	50

## **SİMGELER ve KISALTMALAR**

Ark. → arkadaşları.

ATP → Adenozin trifosfat

BAX → Bcl-2-associated X protein

BCL2 → B-cell lymphoma 2, apoptozisi düzenleyen genlerdendir.

ECG → (-)-epicatechin-3-gallate

EGC → epigallocatechin

EGCG → (-)-epigallocatechin-3-gallate

GPX → Glutasyon peroksidaz

HO-1 → hem oksijenaz – 1

IGF-1 → İnsülin benzeri büyüme faktörü – 1

MDA → Malonildialdehit

NF-kappaB → Nükleer faktör kappa b

RER → granüllü endoplazmik retikulum

RNA → Ribonükleik asit

SOD → Süperoksit dismutaz

STAT → Signal Transducer and Activator of Transcription

TNF- $\alpha$  → Tümör nekroz faktörü alfa

VEGF → Vasküler endotelyal growth factor

WKY → Wistar Kyoto

## 1.GİRİŞ

Uzun süre iskemiye maruz kalan dokuların tekrar kanlanması ile iskemi sırasındaki doku hasarının şiddetlenmesi durumuna iskemi-reperfüzyon veya kısaca reperfüzyon hasarı denmektedir. Reperfüzyon hasarının altında yatan mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte myokard iskemisi, stroke, vasküler hastalıklar, organ transplantasyonu ve şok gibi pek çok önemli klinik sorunun temelini oluşturur. (1,2)

Plastik Cerrahi açısından reperfüzyon hasarı, replantasyon uygulamalarında, serbest doku aktarımlarında ve kompozit doku allotransplantasyonlarında başarıyı etkileyebilecek önemli bir patolojik süreçtir. Reperfüzyon hasarını önlemeye veya etkisini azaltmaya yönelik çalışmalar uzun yıllardır devam etmektedir. Deneysel çalışma modellerinde olumlu etkileri saptanan pek çok ajan tanımlanmış olmakla birlikte geniş serili, plasebo kontrollü, randomize çalışmaların eksikliğinden dolayı bu ajanların yaygın klinik kullanımı mevcut değildir. (3)

Yeşil çayın ana biyoaktif bileşenleri (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG), epigallocatechin (EGC), (-)-epicatechin-3-gallate (ECG), ve (-)-epicatechin(EC)-like polyphenolic epicatechin 'den oluşmaktadır. Bunların içinde en yüksek orandaki bileşik EGCG'dir ve en yüksek biyolojik aktiviteyi de EGCG göstermektedir.(61,62) EGCG'nin anti-oksidan (4-20), anti-mikrobial (21-30), anti-inflamatuar (31-40), anti-alerjik (41-46) ve anti-neoplastik (46-60) etkileri daha önce yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir

EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı dokuları koruyucu etkilerinin olduğu myokard (62-68), böbrek (69,70), testisler (71), barsak (72,73), karaciğer (74,75) ve retina (76,77) üzerinde yapılan çalışmalarda gösterilmiş fakat cilt fleplerindeki reperfüzyon hasarına karşı olası koruyucu etkileri incelenmemiştir. Bu çalışmanın amacı sıçanların karın bölgesinde hazırlanan epigastrik arter ada flebinde deneysel iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturup topografik, histolojik ve biyokimyasal değerlendirme yöntemlerini kullanarak EGCG'nin koruyucu etkilerini test etmektir.

## **2.GENEL BİLGİ**

### **2.1. Flep Kan Akımı ve Fizyolojisi**

Flepler plastik cerrahinin temelini oluştururlar. Bir flebi başarılı bir şekilde planlama, düzenleme, ortaya koyma ve yönetme becerisi plastik cerrahinin belirleyici özelliklerindedir. Bir flebi, greftten ayıran özellik yaşamasını sağlayan iç akıma sahip olmasıdır. Greft ise kendi kan damarları oluşuncaya kadar difüzyon ile beslenmeye muhtaçtır. Kendi iç kanlanmasının olması, bir flebe kompleks defektlerin kapatılması yanında, şeklin ve fonksiyonun korunması açısından sınırsız olanaklar sağlar. Bir flebin yaşayabilirliği kendi iç kanlanmasına bağlı olduğu için, bir flebin kanlanma fizyolojisini tam anlamıyla anlamak başarı ile fiyasko arasındaki farkı belirler. (1,78,79)

Bütün dokularda olduğu gibi, bir flebin kanlanması mikro dolaşım ve makro dolaşım bileşenleri içerir. Bütün bu bileşenler, iç ve dış faktörlerden etkilenip, perfüzyon değişikliğine neden olarak fleb yaşayabilirliğini etkileyebilir. Makro dolaşımın anatomisi bir flebi planlama ve tanımlama için kullanılmaktadır. Ana arteryal akımdan giren ve ana venden çıkan akım ise mikro dolaşımın temelini oluşturur. Ve bu akım, besin maddelerinin ve oksijenin dokulara getirilip, artık metabolitlerin ve karbondioksitin dokulardan uzaklaştırılmasını sağlar. Çeşitli maddelerin bu değişim süreci mikro dolaşım düzeyinde ( arteriol- kapiller- venül ve arteriovenöz anastomoz ) gerçekleşir ve flep perfüzyonunun ana kontrol noktası mevcut mikro dolaşımdır. (1,80)

Taylor, fleplerin kanlanmasını sağlayan akımın sadece ciltle sınırlı olmadığını, üç boyutlu bir yapının parçası olarak flebin bütün tabakalarına yayılmış damar ağı tarafından sağlandığını ortaya koymuştur. Bilinen ana kaynak arterin ciltte ve daha derin dokularda dağıldığı anatomik bölgesi anjiozom konseptini tanımlar. Daha yalın bir şekilde anlatacak olursak, anjiozom, bilinen bir vasküler yapı tarafından beslenen kompozit doku bloğudur. (81-84)

Flep yaşayabilirliği, metabolik ihtiyaçlar ve kan akımı arasındaki hassas dengeye bağlı olduğu için, flep planlamalarında dokulara spesifik metabolik

ihtiyaçların göz önünde bulundurulması gerekir. Etkili mikrodolaşımın, en yakın besleyici damara olan yakınlık ile bağlantılı olması nedeniyle, aksiyel besleyici damar sistemleri ile beslenen flepler diğerlerine göre daha güvenlidir. Random paternli flepler baskın bir ana damardan beslenmezler, bunun yerine subdermal ve subfasyal plexuslardan gelen kan akımı ile beslenirler. Bunun bir sonucu olarak random paternli flepler daha az güvenlidirler ve uzunlukları pedikülün başlangıcından itibaren kısa bir mesafe ile sınırlanmıştır. Flepleri sınıflarken, tek başına en önemli faktör, flebin aksiyel veya random paternli olup olmamasıdır. (85-87)

Bir flebin kaldırılması ile hassas dengelerle düzenlenmiş olan kan akımında ciddi değişiklikler meydana gelir. Sempatik innervasyonda ani bir kayıp ve bunun sonucunda vazokonstriktör nörotransmitterlerin spontan salınımı meydana gelir. Bu duruma ek olarak, fizyolojik olarak var olan damarların kesilmesi ile birlikte flep distalinde perfüzyon basıncı düşer ve flep distalinde akut iskemi meydana gelir. Takip eden 24 saat içinde, flebin periferik bölgesinde meydana gelen olayların sonucunda, flebin ne kadarlık kısmının yaşayacağı belirlenir.(78,88) Banburg ve arkadaşları cremastic kas flebi üzerinde yaptıkları çalışmada, flebin distalinde elevasyon sonrasında üç fazlı dinamik bir yanıtın meydana geldiğini tariflemişlerdir. İlk olarak hiperadrenerjik faz, bunu takiben belirgin vazodilatasyonun olduğu non-adrenerjik faz, sonrasında ise kapiller perfüzyon basıncının arttığı ve vazoaktif maddelere aşırı duyarlılığın olduğu son fazdır. ( 89 )

Flep kaldırıldıktan sonra oluşan hemodinamik, anatomik ve metabolik değişiklikler klinik sonucu belirler. Üzerinde en fazla çalışma yapılan konu hemodinamik değişikliklerdir. Palmer, Nathanson ve Kerrigan (90-93) tarafından flep mikrodolaşımı üzerine yapılan çalışmalarda, flep elevasyonundan sonra baz kısmında dolaşımın korunduğu, distal, uç kısımda ise 6 ile 12 saat içinde dolaşımın normalin % 20 sine düştüğü ve sonrasında akımın 1- 2 hafta içerisinde normalin % 75' ine, 3-4 hafta içerisinde ise % 100' üne geri döndüğünü gösterilmiştir.

Flep elevasyonundan sonra meydana gelen değişiklikler şu şekilde özetlenebilir. İlk 12- 18 saat boyunca kan akımını taşıyan damarların akut olarak azalmasına, vazoaktif maddelerin salınımına ve de lökosit aracılı endotel hasarına

bağlı olarak, özellikle flep distalindeki akım dramatik olarak azalır. 6 ile 12 saat boyunca distal kısma yeterli düzeyde akım sağlanmazsa distal kısımda doku ölümü meydana gelir. 12- 24 saat içinde vazoaaktif maddelerin yıkılmasına ve 2- 3 gün içerisinde flep yatağında meydana gelen neoanjiogeneze bağlı olarak kan akımında kademeli olarak artış meydana gelir. Eğer flep distal kısmı 6- 12 saat içerisinde ciddi şekilde iskemide kalırsa, sonrasında artan akım mikrovasküler yatağın kapanmasına ve doku nekrozuna yol açan reperfüzyon hasarını oluşturarak ölü dokuların canlı dokulardan ayrışmasına neden olur. ( 1 )

Flebin iskemik kısımlarının beslenmesi temel olarak pedikülden gelen longitudinal kan akımı ile sağlanırken flep yatağından inoskulyasyonla ve neovaskülarizasyonla da distal kısmın beslenmesine katkı sağlanabilir. Bu durum özellikle hayvanlarda kullanılan deneysel flep modellerindeki gibi, çok ince fleplerde geçerlidir. Klinik uygulamalarda kullanılan kalın fleplerde önemi çok azdır. Bu farklılıklar deneysel flep çalışmalarında göz önünde bulundurulmalı ve flep ile yatak arasında neovaskülarizasyon ile inoskulyasyonu önlemek amacı ile bariyer konulmalıdır. (1)

## **2.2 Flep Kaybı**

Bazı fleplerin tamamı yaşarken neden kimi fleplerin distalinde veya periferinde nekroz görülmektedir? Bu sorunun cevabı multifaktoriyeldir ve anlaşılması da oldukça zordur. Elbette flebin içerdiği dokular, kan akımı açısından ve iskemiye tolerans açısından kritik öneme sahiptir. Söz gelimi cilt fleplerinin, kas fleplerine göre kan akımının daha az olmasına rağmen metabolik ihtiyaçlarının daha az olması nedeniyle periyodik iskemiye toleransları daha fazladır.(1) Reinch (94) tarafından erken dönemde yapılan çalışmalar sonucunda flep distal kısmının yaşayabilirliğinin arteriovenöz şantlara bağlı olduğu ve arteriovenöz shuntların kapiller yatağı besleyici akımı sağladığı düşünülmekteydi. Sonraki dönemlerde yapılan pek çok çalışma arteriovenöz shuntların distal flep yaşayabilirliği üzerinde minimal etkisi olduğunu göstermiştir. Distal flep nekrozuna, küçük arteriollerdeki



vazokonstruksiyon veya perfüzyon basıncının yeterli düzeyin altına inmesi sonucu flep distaline giden son akımın basitçe yetersiz kalması neden olmaktadır. (95-97)

Khiabani ve Kerrigan (98) yaptıkları deneysel çalışmalarda, cilt flepleri ile kas flepleri arasında iskemiye ve reperfüzyona verdikleri yanıt açısından büyük farklılıklar olduğunu göstermişlerdir. Kas fleplerinde reperfüzyon sırasındaki erken fazda kan akımında, flebin distal kısmı da dahil olmak üzere, her yöne belirgin artış meydana gelirken cilt fleplerinde kan akımında azalma oluşur. Flep yaşayabilirliğini artırıcı ajanlar kullanılırken bu farklar göz önünde bulundurulmalıdır.

Arteryal yetmezlik pediküllü fleplerdeki başarısızlığın ana nedenini oluşturmakla birlikte yeterli arteryal akım olmasına rağmen venöz akımdaki yetersizliğin de flep kaybına neden olabileceği gösterilmiştir. (87) Serbest doku aktarımlarında venöz oklüzyon arteryal oklüzyondan daha sık görülür ve hemen düzeltilmez ise flep kaybına neden olabilir. Pediküllü fleplerde her ikisi birden görülebilir ve herhangi bir venöz yetmezliğe arteriyal yetmezlik de eklenirse doku hasarı daha da şiddetlenir. Primer arteriyal ve venöz iskeminin incelendiği deneysel flep modellerinde venöz iskeminin dokulara daha fazla zarar verdiği görülmüştür. (99-101) Benzer şekilde, sekonder iskemi modellerinde, sekonder iskeminin primer iskemiden daha tehlikeli olduğu ve eşit derecedeki arteryal yetmezliğe göre venöz yetmezliğin daha fazla doku hasarına neden olduğu görülmüştür. ( 102,103 )

Kerrigan ve ark. global flep nekrozuna neden olan üç durum tanımlamıştır. 1) İntrinsik kan akımına oranla çok büyük flep planlanması 2) arteriyel tromboz 3) venöz tromboz. Random ve aksiyal paternli fleplerde tromboz, yanlış flep dizaynı, iskemi- reperfüzyon hasarı, mikrodolaşımı etkileyen sistemik faktörler ( hipotansiyon, sigara , sepsis vs. ) veya flebe fiziksel olarak bası olması ( hematoma, pedikulde katlanma gibi ) sonucunda oluşan mikrodolaşım seviyesindeki düşük akıma sekonder olarak meydana gelir. (95,103) Serbest fleplerde ise arteryal ve venöz oklüzyon sıklıkla anastomoz hattındaki tromboza bağlıdır. (104,105)

### **2.3 İskemi – Reperfüzyon Hasarı**

İskemi – reperfüzyon hasarı, miyokard enfarktüsü, strok, vasküler hastalıklar, organ transplantasyonu ve strok gibi pek çok önemli klinik durumda karşımıza çıkmaktadır.(2) Uzun süre iskemiye maruz kalan dokulara kan akımının tekrar sağlanması sonucunda iskemi nedeniyle oluşan doku hasarının şiddetlenmesi durumuna reperfüzyon hasarı denmektedir. Serbest doku aktarımlarında, kompozit doku nakillerinde ve replantasyon uygulamalarında doku hasarlarına neden olabileceği için iskemi- reperfüzyon hasarı plastik cerrahi çalışma alanı içerisine de girmektedir (1,3)

Reperfüzyon hasarının altındaki mekanizmalar tam olarak açık olmamakla birlikte (1-3) olası nedenlere geçmeden önce iskeminin hücreler üzerindeki patolojik etkilerinin anlaşılması gerekmektedir.

İskemik dokularda oksidatif fosforilasyon azalır ve hücreler anaerop solunuma yönelir. Hipokside hücreler anaerop metabolizma ( glikoliz ) yoluyla ATP üretimini devam ettirebildikleri halde iskemide hem enerji için gerekli maddelerin tüketilmesi hem de artık metabolitlerin kan akımı olmadığı için temizlenememesi nedeniyle glikoliz uzun süre devam edemez. Bunun net sonucu, hücre içi ATP üretimindeki net düşüştür, ATP'nin düşmesi ile birbirini tetikleyen hücreye zararlı pek çok patolojik mekanizmanın tetiği çekilir. ( 2,106,107 )

- Plazma membranındaki ATP bağımlı sodyum pompasının aktivitesi azalır. Bunu sodyumun hücre içi birikimi ve potasyumun hücre dışına çıkışı izler. Bu sodyum eriğinin net artışı, suyun hücre içi artışı ile birlikte olup akut hücresel şişme oluşturur. Bu şişme, inorganik fosfatlar, laktik asit ve pürin nükleozitler gibi metabolitlerin birikimi ile artan osmotik yükü daha da artar.(2)
- ATP nin azalması, fosfofruktokinaz enzimini uyaran adenozin monofosfatta artmaya neden olur ve sonuçta glikoliz artar. Glikolizin artması hücre içi laktik asit ve inorganik fosfatların birikimine neden olarak hücre içi ph'ı azaltır. Azalan ph ve ATP seviyeleri ribozomların granüllü endozkopik retikulumdan ( RER) ayrılmasına ve polizomların monozomlara ayrışmasına neden olur. Bu durum protein sentezinde azalma ile sonuçlanır.(2)

- Sitoplazmik serbest kalsiyum normalde ATP bağımlı kalsiyum taşıyıcıları ile hücre dışı kalsiyumdan 10000 defa daha az konsantrasyonda tutulur. ATP nin azalmasıyla hücre içi serbest kalsiyumda artış meydana gelir. Artan sitoplazmik kalsiyum sırasıyla çeşitli fosfolipazları ( membran hasarını ilerletirler ) , proteazları ( yapısal ve membran proteinlerini katabolize ederler ) , ATP azları ve endonükleazları ( genetik materyali parçalarlar ) aktive eder.(2)
- Tüm memeli hücreleri esas olarak oksidatif metabolizmaya bağımlı olduğundan mitokondriyal bütünlük, hücrelerin hayatta kalabilmeleri için çok gereklidir. Sitoplazmik kalsiyumun, hücre içi oksidatif stresin ve lipit yıkım ürünlerinin artmasıyla mitokondriyal iç membranda, non spesifik porlar oluşmaktadır. Bu porlara mitokondri geçirgenlik porları denmektedir. Mitokondri iç membrandaki bu porlar membran üzerindeki depolarizasyonun kaybına neden olarak ATP oluşumunu önlemektedir.(2)

Yukarıda bahsedilen tüm olaylar hücre tipine, durumuna, uyum yeteneğine ve genetik yapısına bağlı olarak belirli bir süreye kadar geri dönüşümlüdür. Fakat iskemi devam ettiği sürece belli bir noktadan sonra irreversible ( geri dönüşümsüz ) hücre hasarı meydana gelir.(2)

Eğer hücreler reversible zedelenirse, kan akımının düzelmesiyle birlikte hücrelerde iyileşme görülürken bazı durumlarda, iskemik fakat yaşayabilen dokularda kan akımının düzeltilmesi, zedelenmeyi hızlandırarak şiddetlendirir.(2) Bu duruma iskemi – reperfüzyon zedelenmesi denir. Daha öncede belirtildiği gibi iskemi – reperfüzyon hasarının altındaki mekanizmalar tam olarak aydınlatılamamıştır.(1-3) Olası mekanizmalar şu şekilde açıklanmaktadır;

- Kan akımının yeniden sağlanması ile hücrelerin kendi iyonik çevreleri düzelmemişken yüksek miktarda kalsiyum ile karşı karıya kalırlar. Artan hücre içi kalsiyum, hücre için zararlı pek çok enzimi aktive ederek, hücre bütünlüğünün kaybına neden olur. ( şekil ) (2)
- Zedelenmiş hücrelerin yeniden kanlanması iltihabi hücrelerin lokal olarak yeniden gelmesini artırır, bu hücreler membran hasarının yanı sıra

mitokondriyal geçirgenliği biraz daha arttıran yüksek seviyelerde oksijen kaynaklı reaktif türevleri serbest bırakır. (1,2)

- Serbest radikal oluşumuna neden olan diğer bir mekanizma da ksantin oksidaz enzimi aracılığla gerçekleşir. Uzun süren iskemi sonucunda hücrelerde ATP hipoksantine kadar yıkılır. Reperfüzyonla birlikte hücre içinde oluşan yüksek oksijen ve kalsiyum varlığında, hipoksantinden ksantin oksidaz enzimi aracılığı ile ksantin ve süperoksit radikali oluşur. (1,2)

Yukarıda sayılan mekanizmaların ortak sonucu olarak reperfüzyon esnasında hücrelerde serbest radikal oluşumunda patlama yaşanır. ( 1-3)

Serbest radikaller hücre membran hasarının yanında, özellikle mitokondri hasarına neden olur. Daha önce bahsedildiği gibi, uzun süre iskemide kalan hücrelerde mitokondri iç membranında non spesifik porlar oluşmaktadır. Reperfüzyon sırasındaki serbest radikal oluşumundaki aşırı artış mitokondri iç membranındaki porların oluşumunu hızlandırarak membran üzerindeki depolarizasyonun kaybına, matriks ödemine ve sonuçta mitokondri dış membranında rüptüre neden olmaktadır. Bütün bu olaylar sonucunda hücre içi ATP üretimi durma noktasına gelir ve ayrıca hücre içine sitokrom c gibi apoptozisi tetikleyen maddeler salınır. (1-3,108-110)

Serbest radikaller ayrıca nötrofillere karşı güçlü kemotaktik etkilere de sahiptir. Bu yönleriyle nötrofillerin reperfüze olana hızlı göçüne neden olarak nötrofil aracılı doku hasarına katkıda bulunurlar. (1)

İskemi – reperfüzyon hasarının karakteristik özelliklerinden birisi de endotel disfonksiyonudur. Reperfüzyon mikrovasküler düzeyde vazokontraksiyona ve kapiller perfüzyonda düşüşe neden olur. Bu değişikliklerin intra-arteriyel VEGF infuzyonu ile önlenebileceği Wang ve ark. tarafından gösterilmiştir. (111, 112)

Reperfüzyonun indüklediği hücre ölümünde sadece doku nekrozunun mutlak mekanizma olduğu görüşü değerini yitirmiştir. Wang ve ark. sıçan gracilis kası üzerinde yaptıkları çalışmada uzun süreli iskemi sonrasındaki reperfüzyon sürecinde hücre nekrozunun yanında apoptozisin de hücre ölümüne katkıda bulunduğunu saptamışlardır. Baska bir çalışmada, Wang ve ark. iskelet kasındaki reperfüzyon

hasarında apopitozisten en çok endotel hücrelerinin etkilendiğini saptamışlardır.(113,114)

İskemi – reperfüzyon hasarının kompozit doku allotransplantasyonlarında görülebilen doku rejeksiyonunun ana nedenlerinden biri olduğu düşünülmektedir.(3) Pradka ve ark. WKY tipi sıçanlardan Fischer tip sıçanlara 344 adet epigastric flep transplantasyonu yapmış ve 3 saat iskemiye maruz kalan fleplerde 1 saat iskemiye maruz kalanlara göre daha fazla doku reddiyle karşılaşmışlardır. (115)

İskemi – reperfüzyon hasarı tarafından indüklenen gen ekspresyonları üzerine de çalışmalar yapılmıştır. Aravindan ve ark. IGF-1'in (insülin benzeri büyüme faktörü 1) ve siklin bağımlı kinaz inhibitörünün (p27(kip1)) İskemi – reperfüzyon hasarıyla birlikte up-regüle olduğunu göstermiştir. Hsieh ve ark . ise iskemi – reperfüzyon hasarından sonra üç mikro-RNA'nın (miR-21, miR-200c, and miR-205) up-regüle , dört mikro-RNA'nın (Nq01, Pdpn, CXCL3, and Rad23b) ise down-regüle olduğunu göstermiştir. Fakat gen ekspresyonundaki bu değişikliklerin rolü henüz anlaşılamamıştır. (116, 117)

## **2.4 Tedavi Stratejileri**

Son 5 yıl içerisinde cilt veya iskelet kasındaki iskemi – reperfüzyon hasarını azaltıcı çok sayıda terapötik madde, girişimsel veya girişimsel olmayan tedavi yöntemleri üzerine çalışmalar yapılmıştır. Bunlardan bazıları recombinant insan BCL2 proteini, etil piruvat, düşük seviyeli lazer terapisi, hidrojen sulfid, PJ34, poloxamer 188, ketamine, recombinant insan VEGF165 proteini, aktive protein C, receptor-selective agonist, bortezomib, MRS2693, hipertonic salin, cariporide, üzüm çekirdeği proanthocyanidin ekstresi, Wisconsin solüsyonu, ultrason, resveratrol, vitamin E, 12 amino asid peptid ve eritropoetindir.(118-124, 112, 125-135) Bunların önemli bir kısmının olumlu etkilerinin gösterilmiş olmasına rağmen geniş serili çalışmalar yapılmamıştır.(3) Bu bölümde bütün bu terapötik maddelerden bahsetmek yerine en popüler tedavi metotları ve girişimsel yöntemler tartışılacaktır.

Nitrik oksit, iskemi – reperfüzyon hasarında önemli rolü bulunan bir bileşik olup günümüzde etkileri açısından tartışmalar devam etmektedir. Kimi çalışmalarda olumlu etkileri saptanmış olmakla birlikte tam tersini savunan araştırmacılar da mevcuttur. (3) Ward ve ark. yaptıkları bir çalışmada nitrik oksit sentezinin inhibe edilmesiyle on santigrat derecede soğuk iskemiye maruz bırakılan iskelet kasında bile mikrovasküler permeabilitenin arttığını, fakat otuz dört santigrat derecede sıcak iskemiye maruz bırakılan iskelet kasında nitrik oksit sentezinin uyarılmasıyla mikrovasküler permeabilitede artış olmadığını göstermişler ve bu bulgulardan yola çıkarak nitrik oksitin iskemi – reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu savunmuşlardır.(136) Zimiani ve ark. ise sıçan cremasterik kasında yaptıkları bir çalışmada farklı sonuçlar elde etmiştir. Sıçan cremasterik kasında iskemi – reperfüzyon hasarı oluşturup kemiluminisens yöntemiyle toplam doku antioksidan kapasitesini ve membran lipid peroksit düzeyini ölçtükleri çalışmada, zaman – akış eğrisinin reperfüzyon sonrasında artış gösterdiğini fakat reperfüzyondan önce N-nitro-L-arginine methyl esteri (endotelial nitrik oksit sentez inhibitörü) verildiğinde aynı eğride düşüş görüldüğünü saptamışlardır. Buradan yola çıkarak nitrik oksitin iskemi – reperfüzyon hasarında olumsuz etkilerinin olduğunu savunmaktadırlar.(137)

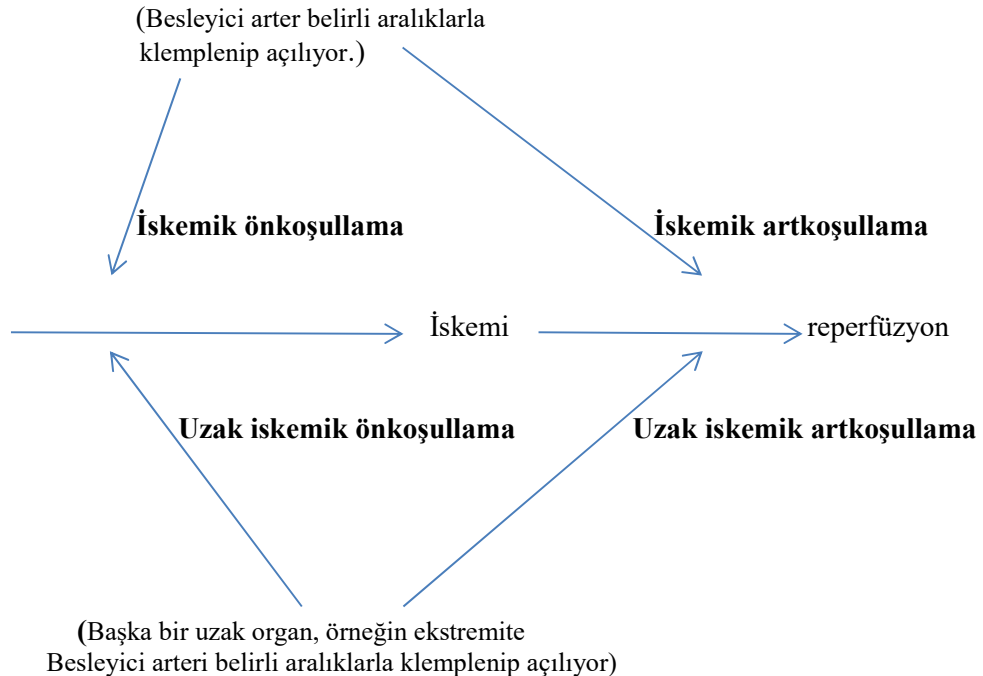
Nötrofil – endotel adezyon blokajının reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu yapılan pek çok deneysel çalışmada gösterilmiştir. Nötrofillerin üzerinde bulunan ve endotel adezyonunda önemli rolü olan CD18 glikoproteinine karşı monoklonal antikörlerin kullanıldığı çalışmalarda, CD18 blokajının reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğu saptanmıştır.(138-139) Benzer sonuçlar nötrofillerin endotel boyunca yuvarlanmasını sağlayan selektin ailesine karşı monoklonal antikörlerin kullanıldığı çalışmalarda da elde edilmiştir.(140-142) Yine nonspesifik nötrofil yuvarlanma inhibitörü olan fucoinidinin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu yapılan bir çalışmada gösterilmiştir. (143)

Statinler koenzim A redüktaz inhibitörü olup hiperkolesterolemi tedavisinde kullanılmaktadırlar. Son yıllarda yapılan çalışmalarda statinlerin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Dillon ve ark (144) yaptıkları bir çalışmada reperfüzyondan önce verilen pravastatinin sıçan iskelet kasında oksidatif hasarı azaltıcı etkilerinin olduğunu göstermişlerdir. Cowled ve ark.

(145) simvastatinin reperfüzyon sonucunda indüklenen nötrofil infiltrasyonunu inhibe ettiğini göstermiştir.

Hiperbarik oksijenin iskemi – reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu gösteren deneysel çalışmalar mevcuttur. Khiabani ve ark hiperbarik oksijenin CD18 blokajı yaparak reperfüzyon sırasında oluşan nötrofil adezyonunu engellediğini göstermişlerdir.(146) Yakın zamanda Jones ve ark yaptıkları bir çalışmada, hiperbarik oksijenin CD18 ve intercellüler adezyon molekülünü inhibe ederek etki gösterebilmesi için nitrik oksitin mediyatörlüğüne ihtiyaç olduğunu göstermişlerdir.(147) Hiperbarik oksijenin kanıta dayalı olarak değerlendirilebilmesi için büyük, randomize klinik çalışmaların gerektiğini vurgulayan araştırmacılar da mevcuttur. (148)

Önkoşullama üzerinde çok fazla çalışma yapılan en popüler grışimsel yöntemlerden biridir. Reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. İskemik önkoşullama, uzak iskemik önkoşullama, iskemik artkoşullama ve uzak iskemik artkoşullama olmak üzere dört tip önkoşullama yöntemi mevcuttur.(3)



**Şekil 1: İskemik koşullama yöntemleri (3)**

Huang ve ark. iskemik önkoşullamanın fonksiyonel kapilerler dansiteyi arttırdığını, lökosit adezyonunu ve migrasyonunu önlediğini rat cremasterik kasında yaptıkları çalışmada göstermişlerdir.(149) Schoen ve ark. iskelet kasında yaptıkları bir çalışmada iskemik önkoşullamanın mikrovasküler perfüzyonu arttırdığını, lökosit endotel bağlantısını ve hücre apoptozisini azalttığını saptamışlar; fakat iskemi – reperfüzyon hasarının indüklediği sinir hasarına karşı iskemik önkoşullamanın herhangi bir koruyucu etkisini tespit edememişlerdir.(150) Eberlin ve ark. fare arka bacağına yaptıkları deneysel çalışmada uzak iskemik önkoşullamanın reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir.(151) Mc Allister ve ark. iskemik art koşullamanın etkilerini domuz latissimus dorsi kasında 4 saatlik iskemi ve 48 saatlik reperfüzyon oluşturdukları çalışma modelinde test etmişler ve artkoşullamanın reperfüzyon sırasında oluşan kas infarktını belirgin azalttığını göstermişlerdir. Artkoşullamanın indüklediği koruyucu mekanizma mitokondri geçirgenlik porlarının oluşumunu inhibe eden cyclosporin ve NIM-811 tarafından taklit edilmekte ve mitokondri geçirgenlik porlarını açan atractyloside tarafından ortadan kaldırılmaktadır. Bu bulgular artkoşullamanın koruyucu etkisinin mitokondri geçirgenlik porları aracılığıyla olduğunu göstermektedir.(152) Tsubota ve ark. ile Eberlin ve ark. uzak artkoşullamanın etkilerini fare arka bacağına test etmişlerdir. Fare sol bacağına oluşturdukları uzak artkoşullamanın farenin sağ bacağına oluşturulan iskemi – reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğunu göstermişlerdir.(153,154)

Günümüzdeki son araştırmalar reperfüzyonun erken döneminde oluşan reaktif oksijen türevlerinin iskemi – reperfüzyon hasarının tetiğini çektiğini göstermektedir. Bu nedenle, Tempol (155), coenzyme Q10 (156), caffeic acid phenyl ester (157), Phlogenzym (158), extracellular superoxide dismutase (159), taurine (160), çinko aspartat (161), melatonin (162,163) gibi pek çok antioksidan maddenin iskemi - reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkileri araştırılmış ve olumlu sonuçlar elde edilmiştir. Ancak çok merkezli randomize çalışmaların eksikliğinden dolayı tek bir antioksidanın veya antioksidan kombinasyonunun reperfüzyon hasarını önlediğini söylemek mümkün değildir.(3)



### **2.4.1 EPIGALLOCATECHİN GALLATE**

EGCG yeşil çayın içindeki en yüksek biyolojik aktiviteyi gösteren polifenol bileşik (61,62) olup güçlü antioksidan (4-20) ve antiinflamatuvar (31-40) etkileri yapılan pek çok çalışmada gösterilmiştir. İskemi – reperfüzyon hasarına karşı olan koruyucu etkileri özellikle iç organlar üzerine yapılan çalışmalarda gösterilmiştir.(62-77)

Giakoustidis ve ark. sıçanda barsak (72) ve karaciğer (73) üzerinde yaptıkları iki ayrı deneysel iskemi – reperfüzyon çalışmasında EGCG nin NF-kappaB ve c-Jun aşağı regülasyonu ile reperfüzyon hasarını engellediğini göstermişlerdir. Kakuta ve ark sıçan böbreğinde EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini inceledikleri deneysel çalışma modelinde, EGCG'nin HO-1 (hem oksijenaz – 1) gen augmentasyonu ile birlikte makrofaj infiltrasyonunu inhibe ederek böbrek üzerine koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.(69) Jang ve ark EGCG'nin iskemi – reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini böbrek üzerinde inceledikleri başka bir çalışmada hem normotansif hem de hipertansif ratlarda EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.(70)

Büttemeyer ve ark. sıçan alt ekstremitesinde iskemi – reperfüzyon hasarı oluşturdukları çalışmalarında EGCG verilen grupta süperoksit radikalinin kontrol gruplarına göre %50 oranında daha az oluştuğunu saptamışlardır. Aynı çalışmada EGCG'nin serbest radikal süpürücü etkisinin C vitaminine göre yüz kat daha fazla olduğu vurgulanmaktadır. (171)

EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerine yönelik çalışmalar özellikle kalp üzerinde yoğunlaşmıştır. Piao ve ark. izole sıçan kalbinde deneysel iskemi – reperfüzyon hasarı oluşturup EGCG'nin etkilerini inceledikleri çalışmalarında, EGCG verilen deney gruplarında reperfüzyondan sonra koroner akımın daha fazla olduğunu, sol ventrikül diyastol sonu basıncının daha düşük olduğunu göstermişlerdir. Ayrıca EGCG verilen deney gruplarında lipid peroksidasyonunun azaldığını, Bcl-2/Bax oranının arttığını ve bunun bir sonucu olarak apoptozise karşı koruyucu etkilerin oluştuğunu göstermişlerdir.(63) Kim ve ark. sıçan kalbi üzerinde yaptıkları deneysel çalışmada EGCG'nin reperfüzyon sonrasındaki infarkt alanını sınırladığını ve kardiyak fonksiyon üzerinde olumlu etkilerinin olduğunu göstermişlerdir.(62) Song ve ark. izole sıçan kalbinde yaptıkları

deneysel çalışmada EGCG'nin mitokondriyal potasyum kanallarını açarak kardiyoprotektif etki gösterdiğini saptamışlardır.(64) Townsend ve ark. sıçan myokardından hazırladıkları hücre kültüründe yaptıkları bir deneysel çalışmada EGCG'nin STAT-1 aktivasyonunu inhibe ederek hücreleri reperfüzyon hasarından koruduğunu göstermişlerdir.(68) Ayrıca EGCG'nin testis (71) ve retina (74,75) üzerinde oluşturulan iskem – reperfüzyon hasarına karşı da koruyucu etkilerinin olduğu gösterilmiştir.

### **3.GEREÇ VE YÖNTEM**

İskemi- reperfüzyon hasarına karşı Epigallocatechin Gallate'nin (EGCG) koruyucu etkilerinin sıçan epigastrik ada flebi üzerinde incelenmesi amacıyla bu deneysel çalışma planlandı. Çalışmada flep modeli olarak sabit anatomik yapısı, diseksiyonunun kolay olması, pedikül varyasyonunun olmaması nedeniyle sıçanda karın flebi model olarak kullanılmıştır. Bu flep ilk olarak 1978 yılında 'geciktirme fenomeni'araştırmalarında kullanılmak üzere Finseth ve Cutting tarafından tarif edilmiştir.(163) 1984'de Petry ve Wortham'ın epigastrik ada flebinin vasküler anatomisini açıklamasıyla, bu anatomik bilgiye dayandırılarak deneysel modellerde planlamalar yapılmaktadır.(164) Epigastrik arter veya inferior epigastrik arter flebi olarak isimlendirilen bu flep modeli, çift pedikül içermesi sayesinde flep dolaşımı ve sağkalımı hakkında çalışmalara olanak sağlamaktadır. (165,166)

Bu çalışmanın cerrahi bölümü Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarında; Histopatolojik araştırma bölümü Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Patoloji Kliniği laboratuvarında; biyokimyasal araştırma bölümü Katip Çelebi Üniversitesi Tıp Fakültesi Atatürk Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Biyokimya Laboratuvarında gerçekleştirildi.

### **3.1-Kullanılan Denekler**

Ağırlıkları 200- 250 gr arasında değişen 80 adet erişkin wistar-albino sıçan araştırmaya dahil edilmiştir. Sıçanlar aynı şartlarda fakat ayrı kafeslerde tutulmuştur. Sıçanlara ad libitum standart sıçan yemi ve su verilmiş ve sıçanlar 12 saat gündüz ve 12 saat gece ortamında tutulmuştur.

### **3.2- Kullanılan Alet ve Malzemeler:**

Çalışmada kullanılan alet ve malzemeler aşağıda gösterilmektedir:

Ketamin HCL  
 Ksilazin  
 Enjektör 5ml  
 Çizim kalemi  
 Flaster  
 Asetat kağıdı  
 Röntgen filmi  
 Povidon-iodin  
 15 numara bistüri  
 Adson penset  
 Steven's doku makası  
 Portegue  
 3/0 ipek  
 1 adet mikro makas  
 1 adet mikro penset  
 Steril gazlı bez  
 Tartı aleti  
 80 adet mini damar klembi  
 Dijital fotoğraf makinesi ( Sony Cyber-shot WX7 )  
 RANSOD (SOD test kiti)  
 RANSEL (GPX test kiti)  
 TNF-a (sıçan tnf-a test kiti)

### **3.3-Sıçan İ inferior Epigastrik Arter Flebinin Hazırlanması**

#### **A) Anatomi:**

Sıçanda epigastrik arter flebi olarak da isimlendirilen karın flebi; ksifoid üst sınır, pubis alt sınır ve yanlarda her iki aksiler çizgi sınırları içinde kalan alanı içerir. Bu anatomik dayanak noktalarına göre daha küçük sıçanlarda daha küçük boyutlu flepler kullanılabilir. Bu çalışmada anatomik kriterlere uygun olarak kraniyal

(üst) kısmı ksifoide, medial sınırı orta hatta denk gelecek şekilde 3\*6 cm lik unilateral flepler hazırlanmıştır. Flep dolaşımı yüzeyel epigastrik arterin medial dalları ve eşlik eden venleri tarafından sağlanmaktadır. Epigastrik arterin lateral dalları nekroz alanı büyüklüğü çalışmasında değişkenliği azaltmak için flebe dahil edilmemektedir. (164,166)

### **B) Cerrahi Yöntem:**

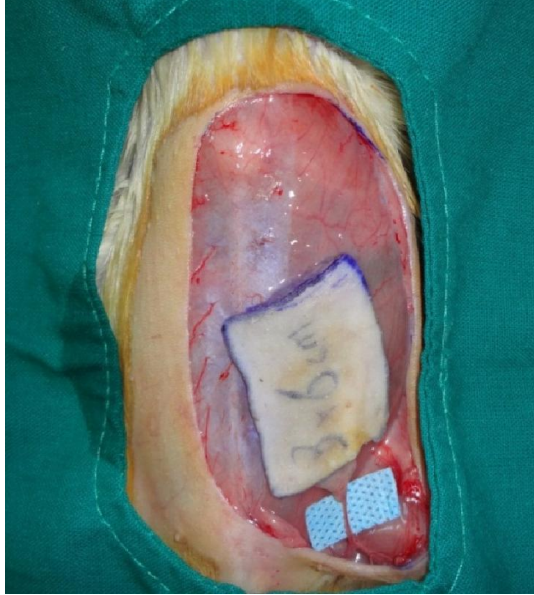
Ketamin (75-100 mg/kg) + Ksilazin (5-10 mg/kg) kombinasyonu intraperitoneal olarak verilerek anestezi sağlandı. Sıçanlar supin pozisyonda iken ekstremitelemi zemine bant ile tespit edildi. Sıçan karın bölgesi tıraş edildikten sonra povidon iodin emdirilmiş steril gazlı bez ile temizlendi. Deneklerin tümünde üst sınırı ksifoide, medial sınırı orta hatta denk gelecek şekilde 3x6cm boyutlarında tek taraflı epigastrik arter flebi planlandı ve uygun çizimler yapıldı (Resim 1).



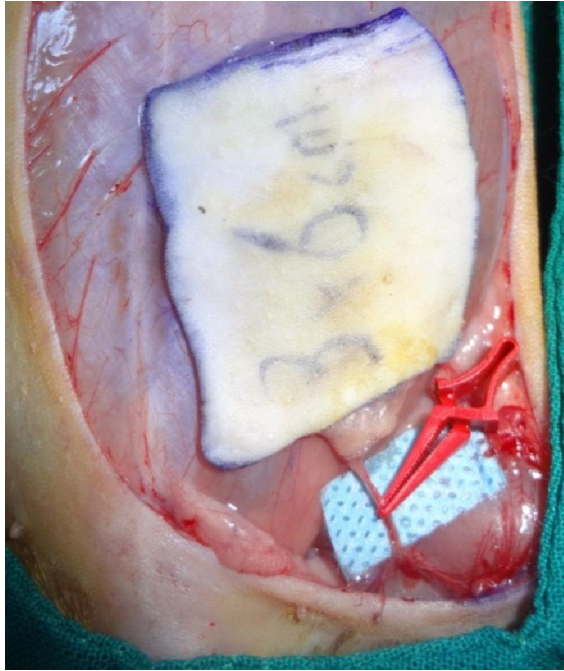
**Resim 1: Anatomik kriterlere uygun flep çizimi**

Anestezi ve çizim sonrasında flebin üst (kranial) sınırı olan ksifoidden geçen yatay hat üzerinden ve her iki yan sınır hattından karın duvarı kasları üzerindeki gevşek plana inecek şekilde insizyonlar uygulandı. Flep disseksiyonu esnasında kranial kısmında torasik arterin uç dalları ile yanlarda epigastrik arterin lateral dalının uzantıları kısa süre klemplenecek kanama kontrol sağlandı. Flep kranyalden kaudale doğru kas üzeri gevşek planda kaudal bazlı olarak yarımada şeklinde

kaldırıldı. Epigastrik pedikül kasık yağ yastığından serbestlendikten sonra kaudal kenar kesisi uygulanarak flep 'ada flebi' haline getirildi (Resim 2). Pedikül klemplenerek flep yerine adapte edildi.(resim 3,4).Tüm deneklerde bu flep standardize edildi.



**Resim 2: Flebin ada şeklinde hazırlanması.**



**Resim 3: Pedikülün klemplenmesi**



*Resim 4: Cerrahi işlemin sonunda flebin 3/0 ipek ile yerine sütüre edilmesi ve denek göğsüne uygulanan koruyucu yelek.*

### **3.4-EGCG'nin Hazırlanışı**

Teavigo, en az %94 oranında saflaştırılmış EGCG içermekte olup DSM Besin Maddeleri Ltd. Sti. Tarafından çalışmamız için ücretsiz olarak sağlanmıştır. Kuru toz halindeki madde üretici firmadan edinilen bilgiler doğrultusunda 1ml'de en fazla 5 mg olacak şekilde steril izotonikte çözülüp her bir sıçana intraperitoneal olarak verilmiştir.

Her bir sıçan çalışmadan önce tartılmış olup sıçanlara 100 $\mu$ mol/kg dozunda EGCG verilmiştir.

(Örn hesaplama: 1 mol EGCG 458,4 gr olup 250 gr ağırlığındaki bir sıçana 11,46 mg EGCG steril izotonikte çözülüp intraperitoneal verilmiştir.)

### **3.5-Deney Protokolü ve Deneklerin Gruplandırılması**

Çalışmada kullanılan 80 adet sıçan, 40 tanesi deney ve 40 tanesi kontrol grubu olmak üzere rastgele iki gruba ayrıldı. Ardından her bir grup kendi içerisinde rastgele 0. 3. 6, 9 ve 12 saatlik iskemi sürelerine maruz bırakılmak üzere 5 alt gruba ayrıldı.

Deney gruplarında, fleplerin reperfüzyonuna 30 dakika kala sıçanlara intraperitoneal 100µmol/kg dozunda intraperitoneal EGCG verildi. Aynı doz reperfüzyondan 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca günlük olarak tekrarlandı. EGCG dozuna literatürdeki çalışmalar göz önünde bulundurularak karar verildi. (64-76) 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

Kontrol gruplarında, fleplerin reperfüzyonuna 30 dakika kala intraperitoneal 2 cc steril izotonik verildi. Aynı doz reperfüzyondan 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca günlük olarak tekrarlandı. Kontrol gruplarına 2 cc izotonik verilmesinin nedeni deney gruplarına verilen EGCG'nin yaklaşık 2 cc steril izotonik içinde çözülerek verilmiş olmasıdır. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

Reperfüzyondan 24 saat sonra flep distalinden 1 cm kalınlığında doku biyokimsal değerlendirme, bu parça alındıktan sonra kalan flep dokusunun orta kısmından wedge eksizyon patolojik değerlendirme için alındı.

Tüm alt gruplara uygulanan cerrahi yöntem aşağıda sunulmaktadır

#### **3.5.A-Deney Grupları**

##### **Deney 0 Saat İskemi Grubu (n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde kaldırıldıktan sonra, pediküle klemleme işlemi yapılmadan intraperitoneal 100µmol/kg EGCG verilip flep 3/0 ipek sütür ile yerine sütüre edildi. Flep yerine sütüre edildikten 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca aynı dozda EGCG intraperitoneal olarak verildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

**Deney 3 Saat İskemi Grubu (n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 3 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal EGCG 100µmol/kg dozunda enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

**Deney 6 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 6 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal EGCG 100µmol/kg dozunda enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

**Deney 9 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 9 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal EGCG 100µmol/kg dozunda enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

**Deney 12 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 12 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal EGCG 100µmol/kg dozunda enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

**3.5.B-Kontrol Grupları****Kontrol 0 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde kaldırıldıktan sonra, pediküle klemleme işlem yapılmadan, intraperitoneal 2 cc izotonik verildikten sonra flep 3/0 ipek sütür ile yerine sütüre edildi. Flep yerine sütüre edildikten 12 saat sonra ve devam eden 4 gün



boyunca aynı dozda EGCG intraperitoneal olarak verildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

### **Kontrol 3 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 3 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal 2 cc steril izotonik enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

### **Kontrol 6 Saat İskemi Grubu (n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 6 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal 2 cc steril izotonik enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

### **Kontrol 9 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 9 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal 2 cc steril izotonik enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

### **Kontrol 12 Saat İskemi Grubu(n=8)**

Flepler ada flebi şeklinde hazırlandıktan sonra pedikül klemplenerek 12 saat boyunca iskemiye bırakıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal 2 cc steril izotonik enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

## **3.6- Hayvanların Bakımı:**

Tüm deneklere cerrahi sonrası povidon-iodin ile pansuman uygulandı. Sıçanlarda otokanibalizasyonu ( 'öze dönük yamyamlık' ) engellemek için gazlı bez, flaster ve röntgen filmi ile hazırlanan koruyucu yelekler kullanıldı. (167) (Resim 4).

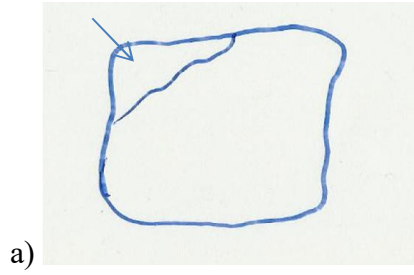
Sıçanlar sabit oda sıcaklığında 12 saat aydınlık – 12 saat karanlık ritmi uygulanan ortamda, su ve standart laboratuvar yemine istedikleri zaman ulaşabildikleri kafesler içinde tek tek yerleştirilerek barındırıldılar.

### **3.7- Değerlendirmeler**

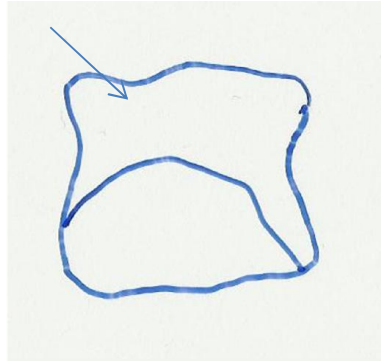
#### **A) Klinik ve Yüzey Alanı (Topografik) Değerlendirmesi:**

Flepler oluşan nekroz ve diğer komplikasyonlar açısından günlük olarak değerlendirildi. Deney süresince sıçan ağırlıklarında değişim gözlenmedi. Yara enfeksiyonu ve fleplerde dikiş hattında ayrışma saptanmadı. 3 saat lik iskemi uygulanan deney grubunda ve 6 saatlik iskemi uygulanan kontrol grubunda birer tane sıçan 24 saat sonra verilen ikinci doz anesteziden sonra kaybedildi. Ayrıca 12 saat iskeminin uygulandığı kontrol grubunda 2 ve deney grubunda 1 sıçanda mikroklempten açıldıktan sonra epigastrik pedikülden akım sağlanamaması üzerine bu sıçanlar çalışmadan çıkarıldı. Ölen veya çalışmadan çıkarılan sıçanlar nedeniyle denek sayısında eksilme olan gruplardaki denek sayısı ek çalışmam ile sekize tamamlandı. Böylece grupların hepsinde sekiz adet sıçanla çalışılmış oldu. Deneysel çalışmalarda flep sağkalımı operasyon sonrası 5. veya 7. günde değerlendirilebileceği belirtilmiştir.(168-170) Bu çalışmada cerrahi sonrası 7. günde flep sağkalımı ve yüzey alanı değerlendirildi. Flep yüzey alanı ölçümleri için asetat üzerine flebi ve nekroz alanını gösteren 1/1'lik çizimler yapıldı.(resim 5)

Ardından asetatlar standart A4 kağıdının üzerine koyulup tarayıcıdan geçirilerek bilgisayara çizimler aktarıldı. Bilgisayara aktarılan çizimler Photoshop CS 5.1 Extended Deneme Sürümünde resim olarak açıldı. Programda açılan resimler üzerinde 'magic wand tool' aracı kullanılarak yaşayan flep alanı, nekroze flep alanı ayrı ayrı seçildi. Seçim işleminden sonra 'essential' sekmesi 'workspace' modunda iken histogram penceresi açıldı ve histogram penceresi 'expanded' modda iken gösterilen pixel sayıları kaydedildi. Aynı çalışma fotoğraflarında önceden ölçülerek tarayıcıda eş zamanlı taranan 1 cm<sup>2</sup> 'lik alanın pixel sayısı yukarıda anlatılan yöntem ile belirlendi. Fleplerden elde edilen pixel sayıları 1 cm<sup>2</sup>'lik alanın pixel sayısına bölünerek fleplerdeki her bir pixel sayımı cm<sup>2</sup> kare cinsinden hesaplandı. Fleplerdeki nekroze ve yaşayan flep alanları cm<sup>2</sup> cinsinden hesaplandıktan sonra oranlanarak % cinsinden flep nekroz oranlarına ulaşıldı.



a)



b)

**Resim 5: a) deney grubuna ait örnek asetate çizimi. Ok işareti nekroza giden alanı göstermektedir**  
**b) kontrol grubuna ait örnek asetate çizimi. Ok işareti nekroza giden alanı göstermektedir.**

### **B) Histopatolojik Değerlendirme :**

Histopatolojik çalışma aynı patolog tarafından hangi doku örneğinin hangi gruba dahil olduğunu bilmeden ve doku örnekleri içinden rastgele seçim yapılarak gerçekleştirilmiştir. Doku örnekleri, reperfüzyondan 24 saat sonra flep distal 1 cmlik kısmı biyokimya analizi için eksize edildikten sonra kalan dokunun distalinden orta kısımdan wedge eksizyon şeklinde alınmıştır.(resim5)

Histolojik çalışma için formalinde fikse edilen doku örnekleri rutin doku takip işlemlerinin ardından parafine gömülerek 3 mikronluk kesitler alındı. Hematoksilen eozin boyası ile ışık mikroskopunda polimorf nükleuslu lökositlerin en yoğun olduğu bölgede 1 mm<sup>2</sup> alanda nötrofil sayımı yapıldı.

### C) Biyokimyasal Değerlendirme

Reperfüzyondan 24 saat sonra flep distalinden 1 cm kalınlığındaki doku MDA(malonildialdehit), SOD (süperoksit dismutaz), GPX (glutasyon peroksidaz) ve TNF- $\alpha$  (tümör nekroz faktörü-alfa) düzeylerine bakılmak üzere eksize edildi.(resim6)



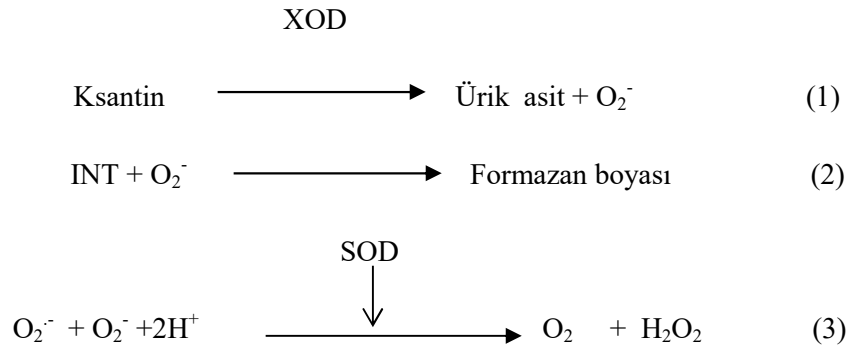
Resim 6: Kalın siyah ok: reperfüzyondan 24 saat sonra flebin distalindeki 1 cm kalınlığındaki biyokimyasal değerlendirme için eksize edilen kısım.

İnce siyah ok: Histopatolojik inceleme için eksize edilen kısım.

Dokularda enzim, MDA ve TNF- $\alpha$  düzeylerine bakılabilmesi için öncelikle homojenizasyon işlemi yapıldı. Homojenizasyon için her bir grubun cilt eksizyon materyalleri tartılarak 1/9 oranında soğuk fosfat tamponuyla (100mmol/L, pH:7.0)

buz üzerinde, homojenizatörle (Ultra-Turrax T25, Almanya) 10.000 devirde 2 dakika süreyle homojenize edildi. Bu süre sonunda elde edilen %10 luk homojenatlar 30 saniye süreyle sonifikiye edilerek 10.000 g' de +4°C de santrifüj edildi. Süpernatant kısımdan SOD ve GPX antioksidan enzim aktiviteleri ile TNF alfa ve protein düzeyleri ölçüldü.

Süperoksid dismutaz aktivitesi ölçümü Woolliams ve arkadaşlarının metoduna dayanmaktadır. (186) Süperoksid dismutaz çeşitli yollarla ortaya çıkan süperoksid ( $O_2^-$ ) radikalinin  $H_2O_2$ ' ye (hidrojen peroksit) dismutasyonu reaksiyonunu katalizler. Bu metod, Ksantin – ksantin oksidaz (XOD ) sistemi tarafından üretilen  $O_2^-$  radikallerinin (reaksiyon 1) 2-(4-iodophenyl)-3-4-(4-nitrophenol)-5-phenyl tetrazolium chloride (INT) ile meydana getirdiği kırmızı renkli formazan boyasının (reaksiyon 2) 505 nm dalga boyunda verdiği optik dansitenin spektrofotometrik olarak okunması esasına dayanmaktadır. Bu reaksiyona dayanan optik dansitedeki azalmadan yararlanarak SOD tarafından reaksiyonun % inhibisyonu belirlendi.

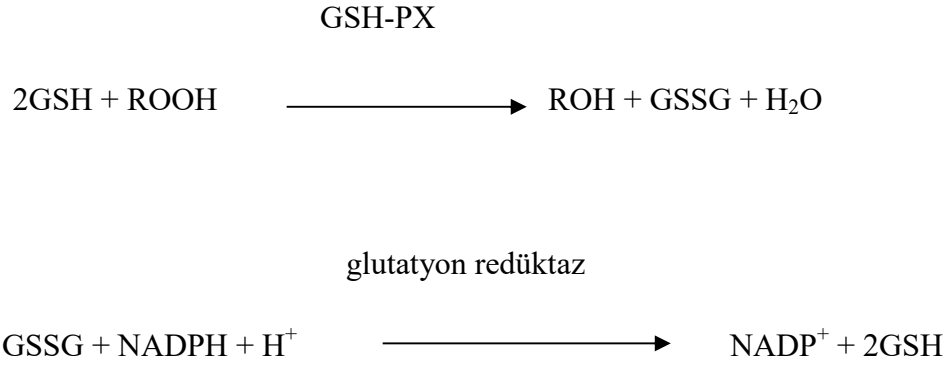


Şekil 2: SOD reaksiyonları.

Daha önce standart çalışılarak hazırlanan % inhibisyon-konsantrasyon grafiğinden yararlanılarak konsantrasyonlar saptandı. Enzim aktivitesi U/ml olarak bulundu. Bu değerler dilüsyon katsayısı ile çarpılıp proteine bölünerek U/mg protein birimi şeklinde sonuçlar elde edildi.

Glutasyon peroksidaz aktivite ölçümü Paglia ve Valentine' nin metoduna dayanmaktadır. (187) Glutasyon peroksidaz, cumen hidroperoksid tarafından glutasyon

oksidasyonunu katalizler. Okside glutatyon, NADPH varlığında glutatyon redüktaz tarafından indirgenir. Bu arada NADPH, NADP<sup>+</sup> ye oksitlenir.



Şekil 3: GPX reaksiyonları.

NADPH nin azalmasına bağlı olarak 340 nm de meydana gelen absorbands değişimi ölçülerek enzim aktivitesi hesaplandı.

Homojenatın protein miktarı Lowry yöntemine göre belirlendi ve sonuçlar U/mg protein cinsinden verildi.

Lipid peroksidasyon ürünlerinden olan MDA; Draper ve Hadley'in tiyobarbitürik asit reaktivitesi metodu kullanarak ölçüldü (188). Yağ asidi peroksidasyonunun son ürünü olan MDA, TBA ile reaksiyona girerek, 532 nm de maksimum absorbands veren renkli bir kompleks oluşturur.

Deneyin yapılışı: 0,5 ml örnek üzerine 2.5 ml %10 luk TCA eklenerek karıştırıldı. 15 dakika kaynatılıp soğutuldu. 5000 devir/dk' da 10 dk santrifüj edildi. 2 ml süpernatant alınıp, üzerine 1ml %0.67 lik TBA eklendi. Tüpler karıştırıldıktan sonra 15 dk kaynatıldı ve hemen soğutuldu. 532 nm de absorbandsları, numune yerine distile su konularak hazırlanan köre karşı okundu.

MDA-TBA kompleksinin 532 nm deki ekstinsiyon katsayısından ( $1.56 \times 10^5 \text{ cm}^{-1}\text{M}^{-1}$ ) yararlanılarak nanomol/ml cinsinden MDA değerleri bulundu. Elde edilen değerler, protein değerine bölünerek sonuçlar nanomol/mg protein olarak ifade edildi

TNF alfa düzeyleri enzim bağlayıcı immunosorbent ölçüm yöntemi (ELISA) ile Biotech marka yarı otomatik Elisa cihazında (INVITROGEN ticari marka, Assay *Rat* TNF- $\alpha$  ELISA kit, lot no: 978614A, USA) çalışıldı.

#### **D) İstatistiksel Değerlendirme:**

Verilerin istatistiksel analizi SPSS 15.0 for windows paket programında %95 güvenle yapıldı. SOD ve GPX enzimleri ile TNF- $\alpha$  düzeylerinin, nekroz yüzdelilerinin ve nötrofil sayılarının deney ve kontrol grubu arasında karşılaştırılmasında **Mann Whitney U**, SOD ve GPX enzimleri ile TNF- $\alpha$  düzeylerinin ve nötrofil sayılarının zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirmesinde **Wilcoxon Signed Ranks** test, gruplara bağlı olarak değişkenlerin 0, 3, 6, 9 ve 12 saatlerdeki zamana bağlı olarak değişimleri için **Repeated Measures Anova** istatistiksel analizleri kullanıldı.  $p > 0,05$  istatistiksel olarak anlamsız ve  $p < 0,05$  istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

## **4.BULGULAR**

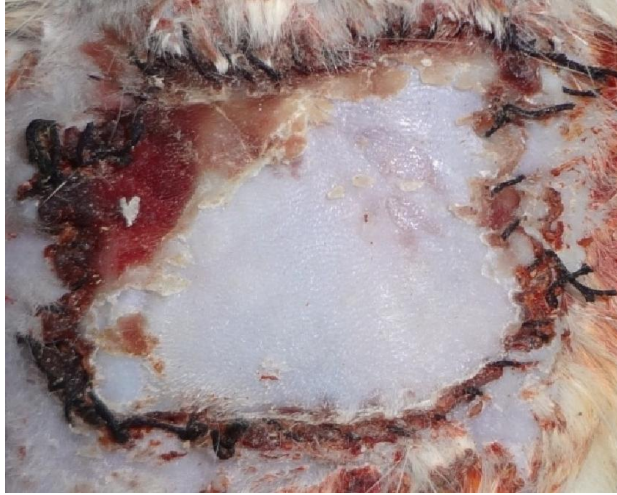
### **4.1- Yüzey Alanı Değerlendirme Sonuçları**

Çalışmamızda 0, 3, 6 saat iskemi uygulanan fleplerde 7. günün sonunda doku nekrozu izlenmedi. 9 saat iskemi uygulanan fleplerde parsiyel doku nekrozu izlendi. 12 saat iskemi uygulanan tüm fleplerde 7. günün sonunda total flep nekrozu görüldü.

9 saat iskemi uygulanan fleplerdeki nekroz oranları tablo 1'de, deney ve kontrol gruplarından örnek iki olgu resim 7 ve 8'de gösterilmektedir.

**Tablo 1: 9 saat iskemi uygulanan fleplerdeki nekroz oranları.**

<b>9 Saat İskemi Sonrası Nekroz Yüzdeleri</b>	<b>Kontrol Grubu</b>	<b>Deney Grubu</b>
<b>1.sıçan</b>	<b>42.91 %</b>	<b>11.36 %</b>
<b>2.sıçan</b>	<b>39.13 %</b>	<b>29.46 %</b>
<b>3.sıçan</b>	<b>30.23 %</b>	<b>19.55 %</b>
<b>4.sıçan</b>	<b>59.48 %</b>	<b>34.54 %</b>
<b>5.sıçan</b>	<b>50.52 %</b>	<b>21.80 %</b>
<b>6.sıçan</b>	<b>23.13 %</b>	<b>10.79 %</b>
<b>7.sıçan</b>	<b>19.78 %</b>	<b>42.23 %</b>
<b>8.sıçan</b>	<b>25.14 %</b>	<b>13.52 %</b>



**Resim 7: 9 Saat iskemi uygulanan deney grubuna ait örnek olgu.**





**Resim 8: 9 Saat iskemi uygulanan kontrol grubuna ait örnek olgu.**

#### **4.2- Histopatolojik Değerlendirme Sonuçları**

Reperfüzyondan 24 saat sonra alınan doku biyopsilerindeki nötrofil sayıları tablo 2 ve tablo 3' te gösterilmiştir.

**Tablo 2: Kontrol gruplarının nötrofil sayıları**

Nötrofil sayısı Kontrol grupları (adet/mm <sup>2</sup> )	0 saat iskemi	3 saat iskem	6 saat iskemi	9 saat iskemi	12 saat iskemi
1. Sıçan	3	5	12	18	18
2. Sıçan	2	7	14	23	22
3. Sıçan	5	7	18	14	26
4. Sıçan	1	12	15	23	20
5. Sıçan	6	4	13	18	24
6. Sıçan	2	6	18	18	20
7. Sıçan	3	3	14	24	22
8. Sıçan	4	10	11	19	26

**Tablo 3: Deney gruplarının nötrofil sayıları**

Nötrofil sayısı Deney grupları (adet/mm <sup>2</sup> )	0 saat iskemi	3 saat iskemi	6 saat iskemi	9 saat iskemi	12 saat iskemi
1. Sıçan	1	5	10	16	20
2. Sıçan	2	4	8	20	18
3. Sıçan	3	5	11	16	22
4. Sıçan	1	6	12	18	22
5. Sıçan	4	10	13	14	18
6. Sıçan	2	6	14	16	18
7. Sıçan	3	3	14	24	22
8. Sıçan	4	10	11	19	26

### **4.3- Biyokimyasal Değerlendirme Sonuçları**

Reperfüzyondan 24 saat sonra flep distalinden alınan 1 cm kalınlığındaki dokudaki SOD, GPX ve TNF- $\alpha$  düzeyleri tablo 4 ve tablo 5 gösterilmektedir.

**Tablo 4: Deney gruplarının iskemi sürelerine göre ölçülen enzim düzeyleri.  
(her bir grubun median değeri gösterilmiştir.)**

Deney grupları	0 saat iskemi	3 saat iskemi	6 saat iskemi	9 saat iskemi	12 saat iskemi
SOD düzeyi (U/mg protein)	<b>0.06</b>	<b>0.05</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.03</b>
GPX düzeyi (U/mg protein)	<b>11.31</b>	<b>9.64</b>	<b>8.15</b>	<b>5.37</b>	<b>4.88</b>
TNF- $\alpha$ düzeyi (pg/mg protein)	<b>2.29</b>	<b>2.93</b>	<b>3.2</b>	<b>3.26</b>	<b>4.65</b>
MDA düzeyi Nanomol/mg protein)	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>	<b>0.06</b>	<b>0.13</b>	<b>0.21</b>

**Tablo 5: Kontrol gruplarının iskemi sürelerine göre ölçülen enzim düzeyleri (her bir grubun median değeri gösterilmiştir.)**

Kontrol grupları	0 saat iskemi	3 saat iskemi	6 saat iskemi	9 saat iskemi	12 saat iskemi
SOD düzeyi (U/mg protein)	<b>0,05</b>	<b>0.04</b>	<b>0.03</b>	<b>0.02</b>	<b>0.02</b>
GPX düzeyi (U/mg protein)	<b>8.85</b>	<b>8.85</b>	<b>8.15</b>	<b>4.88</b>	<b>2.18</b>
TNF- $\alpha$ düzeyi (pg/mg protein)	<b>2.81</b>	<b>3.26</b>	<b>3.32</b>	<b>4.15</b>	<b>4.89</b>
MDA düzeyi (Nanomol/mg protein)	<b>0.04</b>	<b>0.06</b>	<b>0.09</b>	<b>0.24</b>	<b>0.28</b>

SOD ve GPX enzim düzeyleri deney gruplarında yüksek, MDA ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ise deney gruplarında düşük bulunmuştur

#### **4.4- İstatiksel Değerlendirme Sonuçları**

Kontrol grubu olguların 0-3-6-9-12. saat SOD enzim düzeyleri deney grubu olguların SOD enzim düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **düşük** bulundu ( $p<0,05$ ).

SOD enzim düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde (Repeated measures ANOVA); grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $F:0,775$   $p:0,546$   $p>0,05$ ), Beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $F:327,92$   $p:0,001$   $p<0,05$ ).

Deney ve kontrol grubu olguların SOD enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları incelendiğinde; tüm ikili karşılaştırmalar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

SOD düzeylerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 6-7 ve grafik 1'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir

**Tablo 6: Olguların 0-3-6-9-12. saat SOD enzim düzeyleri ortalama dağılımı.**

	Grup				Toplam		p*
	Kontrol		Deney		Ort.±SS	Median	
	Ort.±SS	Median	Ort.±SS	Median			
0.SAAT	0,05±0	0,05	0,06±0	0,06	0,06±0,01	0,06	<b>0,001</b>
3. SAAT	0,04±0	0,05	0,05±0	0,05	0,05±0,01	0,05	<b>0,001</b>
6. SAAT	0,03±0	0,03	0,04±0	0,04	0,03±0,01	0,03	<b>0,002</b>
9. SAAT	0,02±0	0,02	0,03±0	0,03	0,03±0,01	0,03	<b>0,001</b>
12. SAAT	0,02±0	0,02	0,03±0	0,03	0,02±0,01	0,02	<b>0,001</b>

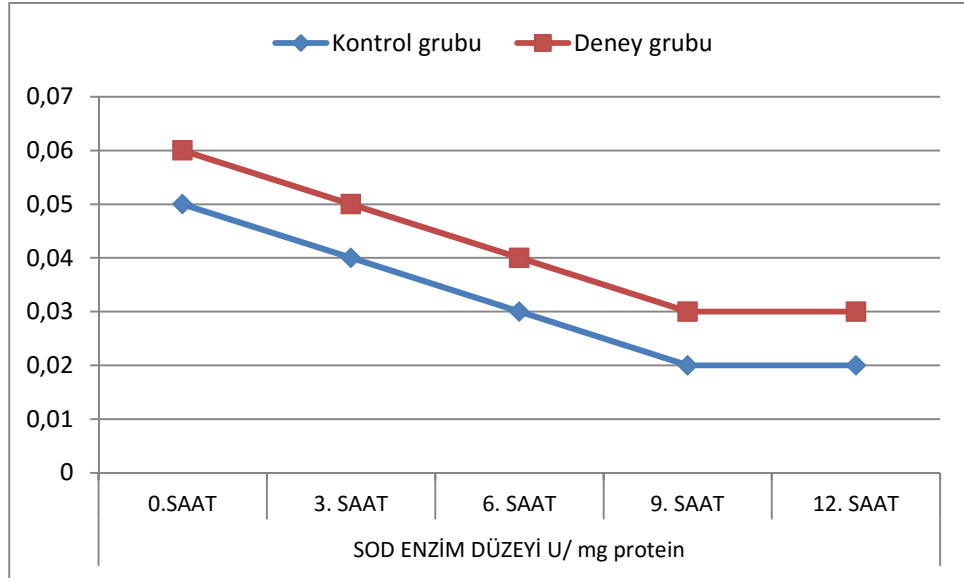
\*Mann Whitney U analizi

**Tablo 7: Deney ve kontrol grubu olguların SOD enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları**

	p*	
	Kontrol	Deney
0.Saat - 3.saat	0,031	0,012
0.Saat - 6.saat	0,011	0,011
0.Saat - 9.saat	0,011	0,011
0.Saat - 12.saat	0,012	0,012
3.saat - 6.saat	0,011	0,011
3.saat - 9.saat	0,011	0,011
3.saat - 12.saat	0,012	0,011
6.saat - 9.saat	0,034	0,011
6.saat - 12.saat	0,012	0,011
9.saat - 12.saat	0,017	0,011

\*Wilcoxon signed ranks test

**Grafik 1: Deney ve kontrol grubu olguların zamana göre SOD enzim düzeylerinin değişimi**



Kontrol grubu olguların 0-3-9-12. Saat GPX enzim düzeyleri deney grubu olguların GPX enzim düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **düşük** bulundu ( $p<0,05$ ). 6. Saat enzim düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

GPX enzim düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde (Repeated measures ANOVA); grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $F:706,61$   $p:0,001$   $p<0,05$ ), beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $F:14950,23$   $p:0,001$   $p<0,05$ ).

Deney ve kontrol grubu olguların GPX enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları incelendiğinde; kontrol grubu 0. ve 3. saat GPX enzim düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Diğer tüm ikili karşılaştırmalar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

GPX düzeylerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 8-9 ve grafik 2'de ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 8: Olguların 0-3-6-9-12. saat GPX enzim düzeyleri ortalama dağılımı**

	Grup				Toplam		p*
	Kontrol		Deney		Ort.±SS	Median	
	Ort.±SS	Median	Ort.±SS	Median			
0.SAAT	8,85±0,09	8,85	11,31±0,06	11,31	10,08±1,27	10,08	<b>0,001</b>
3. SAAT	8,85±0,09	8,85	9,64±0,07	9,64	9,25±0,41	9,24	<b>0,001</b>
6. SAAT	8,15±0,14	8,15	8,15±0,09	8,15	8,15±0,12	8,15	0,959
9. SAAT	4,88±0,12	4,87	5,37±0,1	5,37	5,12±0,28	5,18	<b>0,001</b>
12. SAAT	2,18±0,07	2,18	4,88±0,03	4,88	3,53±1,4	3,56	<b>0,001</b>

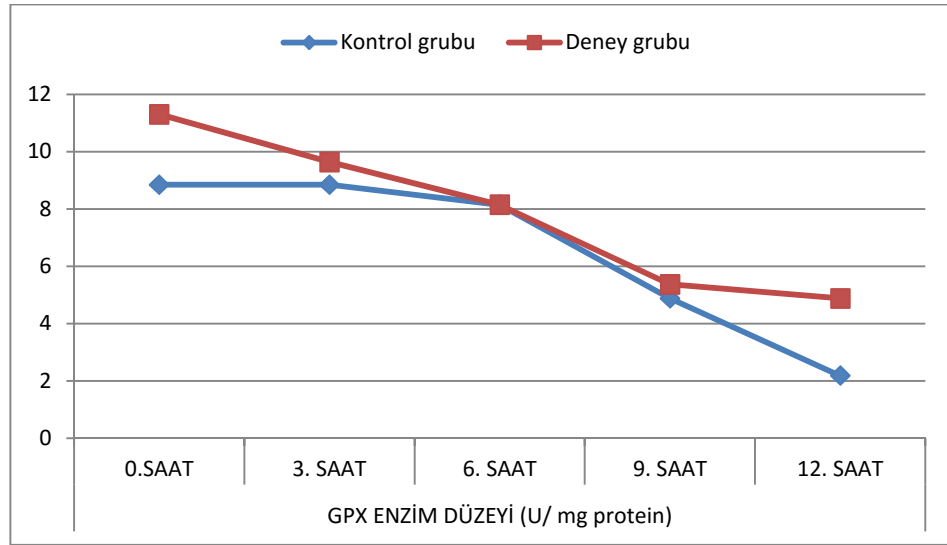
\*Mann Whitney U analizi

**Tablo 9: Deney ve kontrol grubu olguların GPX enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları**

	p*	
	Kontrol	Deney
0.Saat - 3.saat	0,414	0,012
0.Saat - 6.saat	0,012	0,011
0.Saat - 9.saat	0,012	0,012
0.Saat - 12.saat	0,012	0,011
3.saat - 6.saat	0,012	0,012
3.saat - 9.saat	0,012	0,008
3.saat - 12.saat	0,012	0,012
6.saat - 9.saat	0,011	0,012
6.saat - 12.saat	0,011	0,011
9.saat - 12.saat	0,011	0,012

\*Wilcoxon signed ranks test

**Grafik 2: Deney ve kontrol grubu olguların zamana göre GPX enzim düzeylerinin değişimi**



Kontrol grubu olguların 0-3-6-9-12. saat TNF- $\alpha$  düzeyleri deney grubu olguların TNF- $\alpha$  düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **yüksek** bulundu ( $p < 0,05$ ).

TNF- $\alpha$  değerlerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde (Repeated measures ANOVA); grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $F:100,80$   $p:0,001$   $p < 0,05$ ), beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $F:3166,33$   $p:0,001$   $p < 0,05$ ).

TNF- $\alpha$  düzeylerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 10-11 ve grafik 3'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 10: Olguların 0-3-6-9-12. saat TNF- $\alpha$  değerleri ortalama dağılımı**

	Grup				Toplam		p*
	Kontrol		Deney		Ort.±SS	Median	
	Ort.±SS	Median	Ort.±SS	Median			
0.SAAT	2,81±0,07	2,81	2,29±0,04	2,29	2,55±0,27	2,53	<b>0,001</b>
3. SAAT	3,26±0,1	3,26	2,93±0,06	2,93	3,09±0,19	3,07	<b>0,001</b>
6. SAAT	3,32±0,1	3,32	3,2±0,07	3,2	3,26±0,1	3,2	<b>0,049</b>
9. SAAT	4,15±0,13	4,15	3,26±0,07	3,26	3,7±0,47	3,64	<b>0,001</b>
12. SAAT	4,89±0,08	4,89	4,65±0,03	4,65	4,77±0,14	4,74	<b>0,001</b>

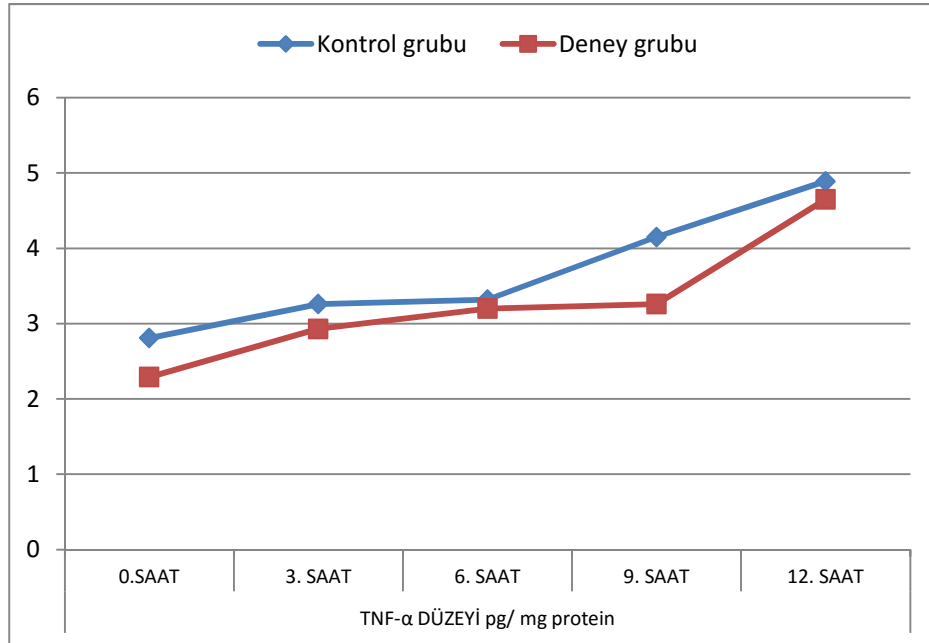
\*Mann Whitney U analizi

**Tablo 11: Deney ve kontrol grubu olguların TNF- $\alpha$  değerlerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları**

	p*	
	Kontrol	Deney
0.Saat - 3.saat	0,008	0,011
0.Saat - 6.saat	0,012	0,012
0.Saat - 9.saat	0,011	0,011
0.Saat - 12.saat	0,010	0,011
3.saat - 6.saat	0,049	0,011
3.saat - 9.saat	0,011	0,008
3.saat - 12.saat	0,011	0,012
6.saat - 9.saat	0,011	0,123
6.saat - 12.saat	0,011	0,011
9.saat - 12.saat	0,011	0,012

\*Wilcoxon signed ranks test

**Grafik 3: Deney ve kontrol grubu olguların zamana göre TNF- $\alpha$  düzeylerinin değişimi**



Olguların 9. Saat nekroz yüzdeleri ve 0-3-6-9-12. Saat nötrofil sayıları ortalama dağılımı incelendiğinde;

Kontrol grubu olguların 9. Saat nekroz yüzdeleri deney grubu olguların 9. Saat nekroz yüzdelerinden istatistiksel olarak anlamlı **yüksek** bulundu ( $p>0,05$ ).



0-3-9-12. saat nötrofil sayıları açısından kontrol ve deney grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Kontrol grubu olguların 6. Saat nötrofil sayıları deney grubu olguların 6. Saat nötrofil sayılarından istatistiksel olarak anlamlı **yüksek** bulundu ( $p<0,05$ ).

Nötrofil sayılarının deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde (Repeated measures ANOVA); grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $F:0,585$   $p:0,680$   $p>0,05$ ), beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $F:247,882$   $p:0,001$   $p<0,05$ ).

9 Saat iskemi uygulanan fleplerdeki yüzey alanı ve tüm grupların nötrofil sayılarının istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 12-13 ve grafik 4'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir.

**Tablo 12: Olguların 9. Saat nekroz yüzdeleri ve 0-3-6-9-12. Saat nötrofil sayıları ortalama dağılımı.**

	Grup				Toplam		p
	Kontrol		Deney		Ort.±SS	Median	
	Ort.±SS	Median	Ort.±SS	Median			
<b>9. SAAT NEKROZ YÜZDELERİ</b>							
	36,29±14,14	34,68	22,91±11,54	20,675	29,6±14,25	27,3	<b>0,049</b>
<b>Nötrofil sayıları</b>							
0.Saat	3,25±1,67	3	2,5±1,2	2,5	2,88±1,45	3	0,442
3.saat	6,75±3,01	6,5	6,13±2,59	5,5	6,44±2,73	6	0,645
6.saat	14,38±2,56	14	11,63±2,07	11,5	13±2,66	13	<b>0,049</b>
9.saat	19,63±3,42	18,5	17,88±3,14	17	18,75±3,3	18	0,382
12.saat	22,25±2,92	22	20,75±2,82	21	21,5±2,88	22	0,328

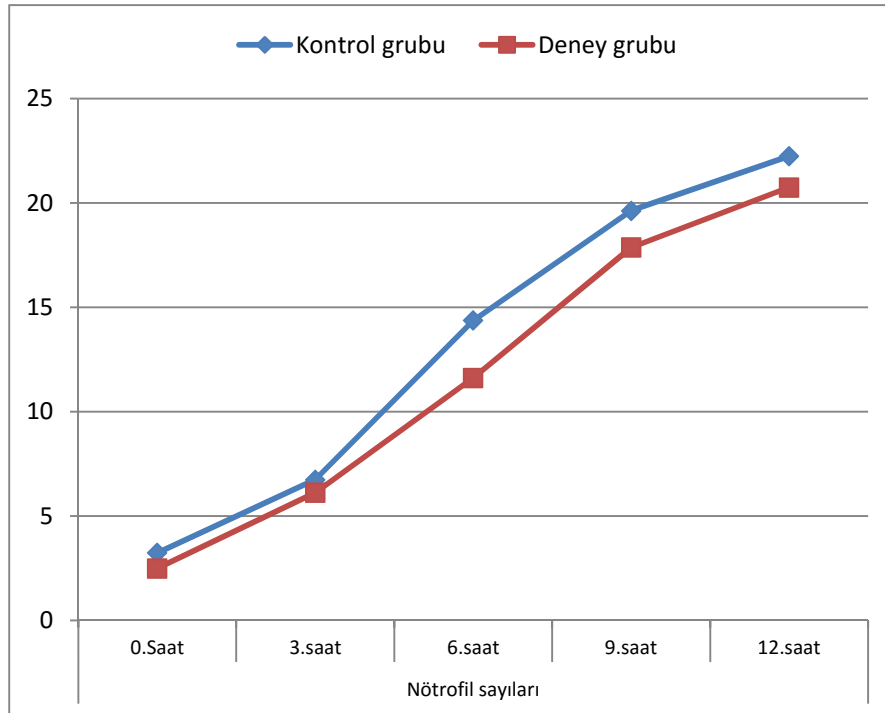
Deney ve kontrol grubu olguların nötrofil sayılarının zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları incelendiğinde; kontrol grubu 9. Saat ile 12. Saat ölçümleri arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı ( $p>0,05$ ). Diğer ikili karşılaştırmalar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

**Tablo 13: Deney ve kontrol grubu olguların nötrofil sayılarının zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları**

	p*	
	Kontrol	Deney
0.Saat - 3.saat	0,043	0,002
0.Saat - 6.saat	0,000	0,000
0.Saat - 9.saat	0,000	0,000
0.Saat - 12.saat	0,000	0,000
3.saat - 6.saat	0,001	0,001
3.saat - 9.saat	0,000	0,000
3.saat - 12.saat	0,000	0,000
6.saat - 9.saat	0,018	0,002
6.saat - 12.saat	0,001	0,000
9.saat - 12.saat	0,199	0,046

\*Wilcoxon signed ranks test

**Grafik 4: Deney ve kontrol grubu olguların zamana göre nötrofil sayılarının değişimi**



Deney grubu olguların 0-3-6-9-12. saat MDA düzeyleri kontrol grubu olguların 0-3-6-9-12. saat MDA düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **düşük** bulundu ( $p<0,05$ ).

MDA düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde (Repeated measures ANOVA); grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $F:2893,007$   $p:0,001$   $p<0,05$ ), beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu ( $F:97,434$   $p:0,001$   $p<0,05$ ).

Deney ve kontrol grubu olguların MDA düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları incelendiğinde; deney grubu olguların 0. ve 3. saat MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,05$ ). Diğer tüm ikili karşılaştırmalar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

MDA düzeylerinin istatistiksel değerlendirme sonuçları tablo 14-15 ve grafik 5'te ayrıntılı olarak gösterilmiştir

**Tablo 14: Olguların 0-3-6-9-12. Saat MDA düzeyleri ortalama dağılımı**

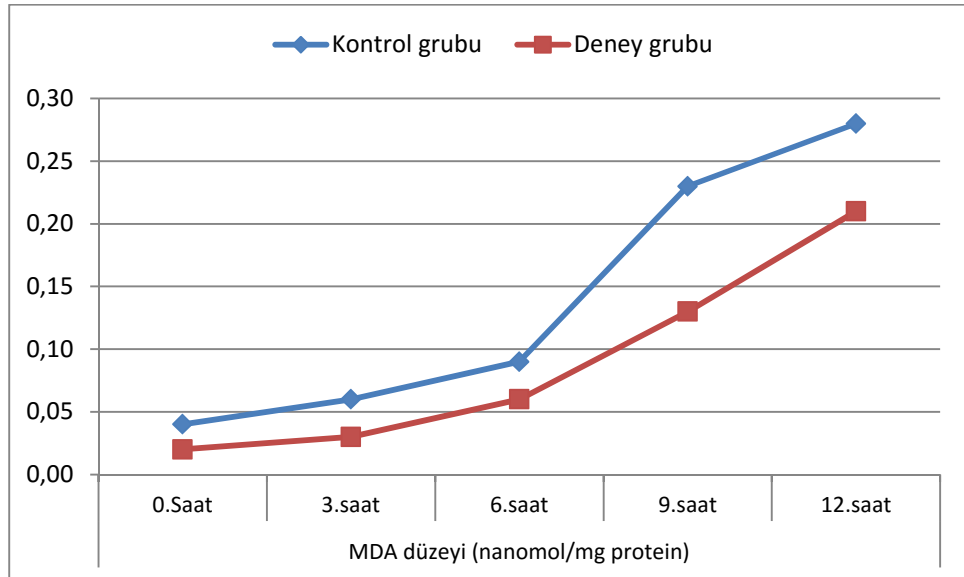
	Grup				Toplam		p
	Kontrol		Deney		Ort.±SS	Median	
	Ort.±SS	Median	Ort.±SS	Median			
0.Saat	0,04±0,00	0,04	0,02±0,01	0,02	0,03±0,01	0,03	<b>0,001</b>
3.saat	0,06±0,01	0,06	0,03±0,01	0,02	0,04±0,02	0,05	<b>0,001</b>
6.saat	0,09±0,01	0,09	0,06±0,01	0,06	0,07±0,02	0,08	<b>0,001</b>
9.saat	0,23±0,01	0,24	0,13±0,01	0,13	0,18±0,06	0,18	<b>0,001</b>
12.saat	0,28±0,01	0,28	0,21±0,01	0,21	0,24±0,03	0,24	<b>0,001</b>

**Tablo 15: Deney ve kontrol grubu olguların MDA düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları**

	p	
	Kontrol	Deney
0.Saat - 3.saat	0,010	0,180
0.Saat - 6.saat	0,010	0,010
0.Saat - 9.saat	0,011	0,011
0.Saat - 12.saat	0,011	0,011
3.saat - 6.saat	0,011	0,011
3.saat - 9.saat	0,011	0,010
3.saat - 12.saat	0,011	0,011
6.saat - 9.saat	0,011	0,011
6.saat - 12.saat	0,011	0,011
9.saat - 12.saat	0,011	0,011

\*Wilcoxon signed ranks test

**Grafik 5: Deney ve kontrol grubu olguların zamana göre sodyum enzim düzeylerinin değişimi**



## **5.TARTIŞMA ve SONUC**

İskemi – reperfüzyon hasarı birden fazla patolojik sürecin ortak sonucu olarak hücrelerde hasar oluşturmaktadır. (1-3) Ancak son yıllarda yapılan çalışmalarda reperfüzyonun erken dönemde oluşan serbest radikal patlamasının iskemi – reperfüzyon hasarındaki patolojik süreçlerin tetiğini çektiğine inanılmaktadır. (3) Serbest radikaller hem kendileri hücrelere zarar vermekte hem de nötrofillere karşı güçlü kemotaktik etki göstererek nötrofil aracılı hasara katkıda bulunmaktadır. (1-3)

İskemi – reperfüzyon hasarıyla ilgili çalışmalar ya antiinflamatuvar etkinlik ya da antioksidan etkinlik üzerine yoğunlaşmıştır. (1,3, 138-142, 145 -148, 155-162) Oysa ki EGCG hem güçlü antioksidan (4-20) hem de bir o kadar antiinflamatuvar (31-40) etkinliğe sahip polifenol bir bileşiktir.

Sıçan epigastrik arter flebinde 0, 3, 6, 9 ve 12 saatlik farklı periyotlarda iskemi uygulamasını takiben reperfüzyondan 30 dakika önce, reperfüzyondan 12 saat sonra ve günlük olarak intraperitoneal 100µmol/kg dozunda EGCG verdiğimiz çalışma modelinde doku hasarı ve EGCG'nin etkileri üç farklı açıdan değerlendirilmiştir.

İlk olarak reperfüzyon sonrasında epigastrik arter flebinde oluşan nekroz yüzdeleri incelenmiştir. 0, 3, 6 saat iskemi uygulanan fleplerde hem deney hem de kontrol gruplarında doku nekrozuna rastlanmamış olup bu durum literatürdeki çalışmalarla da benzerlik göstermektedir. (142) 12 saat iskemi uygulanan fleplerde ise hem deney gruplarında hem de kontrol gruplarında tüm flepler total nekroza gitmiştir. Klein ve arkadaşlarının süperoksit dismutaz transgenik farelerde yaptıkları iskemi – reperfüzyon çalışmasında da 12 saat iskemi uygulanan deney ve kontrol gruplarında tüm fleplerde total nekroz görülmüştür. (172) Benzer şekilde Tosa ve ark. intercelüler adezyon molekülü 1' e karşı monoklonal antikorların iskemi – reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında 12 saat iskemi uygulanan fleplerde kontrol gruplarında ortalama % 0.3 (+/- 1.0) oranında flep sağkalımına rastlamışlardır. (173)

Çalışmamızda 9 saat iskemi uygulanan fleplerde parsiyel nekroz oluşmuştur. Nekroz oranları deney grubunda ortalama %29,6 ( $\pm 14,25$ ), kontrol grubunda ise %36,29 ( $\pm 14,14$ ) oranında bulunmuş olup kontrol gruplarındaki nekroz oranı deney

gruplarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bulunmuştur ( $p>0,05$ ). 9 saat iskemi uygulanan fleplerde EGCG klinik olarak saptanabilen derecede, reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etki göstermiş olmasına rağmen 12 saat iskemi uygulanan fleplerde EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkisi olmamıştır. Bu durumun olası nedeninin EGCG'nin reperfüzyondan hemen önce verilmesi veya uygulama dozu ve sıklığı ile ilgili olabileceğini düşünmekteyiz. Eğer fleplere iskemi uygulaması yapılmadan birkaç gün veya hafta öncesinde EGCG tedavisi başlanırsa veya reperfüzyondan sonra daha sık aralıklarla EGCG verilirse 12 saat iskemi uygulanan grupta da olumlu sonuçların alınabileceğini düşünmekteyiz. Kakuta ve ark. EGCG'nin böbrek üzerinde oluşturdukları iskemi – reperfüzyon hasarındaki etkilerini inceledikleri çalışmalarında deneklere iskemiden 48 saat önce EGCG uygulamaya başlamışlar ve EGCG'nin belirgin derecede koruyucu etkilerini saptamışlardır. (69) Fiorini ve ark. hepatic iskemi – reperfüzyon üzerine yaptıkları çalışmada EGCG'yi deneklere iskemiden önce oral olarak 5 gün, intraperitoneal olarak ise 2 gün önce vermeye başlamışlar ve her iki uygulamada da EGCG'nin koruyucu etkilerini saptamışlardır. Townsend ve ark. EGCG'nin kardiyak miyositler üzerindeki reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerini inceledikleri çalışmalarında iskemiden 7 gün önce sıçanlara oral EGCG vermeye başlamışlardır. Bu çalışmada da EGCG'nin koruyucu etkileri saptanmıştır.(68) Bizim reperfüzyondan hemen önce deneklere EGCG vermemizin nedeni ise reperfüzyon hasarının klinik olarak çoğunlukla akut olarak gelişmesidir. (1-3)

Çalışmamızdaki uygulama dozuna ve sıklığına daha önce de belirtildiği gibi literatür bilgileri ışığında karar verilmiştir. Literatürdeki çalışmalarda EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı kullanılan dozu 10mg/kg dan başlayıp 85 mg/kg'a kadar değişmekle birlikte sıklıkla 50 mg/kg dozundadır. (64-76) EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin incelendiği çalışmalar solid organlar üzerinde yoğunlaştığı ve cilt flepleri ile ilgili çalışma olmadığı için maddenin uygulama sıklığına literatür bilgileri ışığında mümkün olan en az toksik düzeyde olacağını düşündüğümüz günlük 100 $\mu$ mol/kg (yaklaşık 50mg/kg) dozunda devam ettik. Daha yüksek ve daha sık tekrarlanan dozlarda daha başarılı sonuçların elde edilebileceği düşünülebilir fakat yaptığımız araştırmalarda EGCG'nin intraperitoneal uygulaması ile ilgili farmakokinetik çalışmalara rastlanmamış olup bu konudaki çalışmalar

devam ettikçe güvenli uygulama dozu ve uygulama sıklığı gibi maddenin etkinliğini arttırabilecek bilgiler ortaya çıkacak ve bunun sonucunda ileriki dönemlerde yapılacak çalışmalarda belki de daha başarılı sonuçlar alınacaktır.

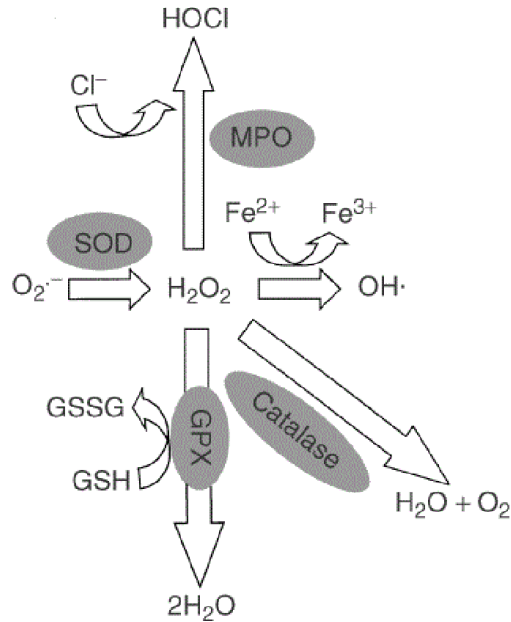
EGCG'nin iskemi – reperfüzyon hasarındaki etkilerini incelediğimiz çalışmamızda ikinci parametre olarak fleplerdeki nötrofil infiltrasyonu değerlendirilmiştir. Nötrofiller inflamasyon bölgesinde 6. saatte görülmeye başlarlar ve 24. saatte pik seviyesine ulaşır yavaş yavaş yerlerini monositlere bırakırlar. 48. Saatten sonra ise inflamasyon bölgesinde baskın iltihabi hücreler monositlerdir. (185)

Çalışmamızda reperfüzyondan 24 saat sonra alınan doku biyopsilerinde çok yoğun nötrofil infiltrasyonu saptanmış olup nötrofillerin en yoğun olduğu bölge seçilip bu bölgedeki 1mm<sup>2</sup> alanda sayım yapılmıştır. 0, 3, 9 ve 12 saat iskemi uygulanan fleplerdeki nötrofil sayıları arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. 6 saat iskemi uygulanan fleplerde ise deney gruplarındaki nötrofil sayıları istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük bulunmuştur. Nötrofil sayıları arasında 6 saat iskemi uygulanan gruplar dışında anlamlı fark oluşmamasının nedeninin nötrofil sayımının 24. Saatte nötrofillerin en pik seviyede oldukları zamanda yapılmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz. Eğer reperfüzyonun daha erken dönemlerinde doku biyopsisi alıp nötrofil sayımı yapılırsa deney gruplarında anlamlı derecede düşük nötrofil infiltrasyonu görülebilir. Ayrıca bu durumun olası başka bir nedeni, EGCG'nin antiinflamatuvar etkilerinin (31-40) olduğu bilinse bile, EGCG cilt fleplerinde oluşturulan reperfüzyon hasarında nötrofil göçünü engellemede etkisiz kalmış olabilir veya nötrofil göçünden ziyade nötrofil etkinliğini azaltarak etki göstermiş olabilir. Bu durumun kantitatif olarak test edilebilmesi için benzer bir çalışmada dokuda nötrofil infiltrasyonunu gösteren myeloperoksidaz (174) enzim aktivitesinin çalışılması yararlı olacaktır.

Çalışmamızda EGCG'nin etkinliğini değerlendirdiğimiz son parametre olarak reperfüzyondan 24 saat sonra flep distalinden 1 cm kalınlığında doku örneği alınmış ve bu örneklerde SOD, GPX ve TNF- $\alpha$  düzeylerine bakılmıştır. Çalışmamızda istatistiksel olarak sadece enzim düzeylerinin gruplar arasındaki farkları değerlendirilmemiş; ek olarak enzim düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için tekrarlayan varyans analizi (Repeated measures ANOVA), grupların

zaman ile etkileşimi ve enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümleri ikili olarak değerlendirilmiştir

SOD (süperoksit dismutaz) ilk kez McCord ve Fridovic tarafından 1969 yılında tanımlanmış olup süperoksit radikalının oksijene ve hidrojen peroksite dönüşümünü katalizleyen ve hücreleri süperoksit radikaline bağlı hasardan koruyan çok önemli bir antioksidan enzimdir. (şekil 2) (175) İnsanda SOD1 sitoplazmik, SOD2 mitokondriyal, SOD3 ekstrasellüler olmak üzere üç alt tipi bulunmaktadır. Her bir alt tipin eksikliğinin farklı patolojik süreçlere yol açtığı düşünülmektedir.(176-178) SOD1 gen defektinin ailesel amiotrofik lateral skleroz



Şekil 2: Antioksidan enzimlerin katalizlediği reaksiyonların özeti.

hastalığına yol açtığı gösterilmiştir. (179,180) SOD2 ve SOD3 eksiklikleri insanlarda herhangi bir hastalık ile kesin olarak ilişkilendirilememiş olsa da deneysel çalışmalarda olumsuz etkileri gösterilmiştir. (176-178)

Çalışmamızda reperfüzyondan 24 saat sonra flep distal kısmındaki total SOD aktivitesi ölçülmüş olup kontrol gruplarının 0-3-6-9-12. saat SOD enzim düzeyleri deney grubu olguların SOD enzim düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **düşük** bulundu. ( $p < 0,05$ ).



SOD enzim düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde; grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulunmadı (F:0,775 p:0,546  $p>0,05$ ), ancak beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu (F:327,92 p:0,001  $p<0,05$ ).

Deney ve kontrol grubu olguların SOD enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları incelendiğinde; tüm ikili karşılaştırmalar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

Bütün bu istatistiksel verilerin net sonucu EGCG verilen deney druplarında SOD düzeylerinin anlamlı derecede yükseldiği yönündedir. Buradan çıkardığımız sonuç ise reperfüzyon esnasında hücrelerde oluşan süperoksit radikale karşı deney gruplarında, SOD enzim düzeylerinin yüksek (SOD enziminin harcanmadığını göstermektedir) saptanmasından ötürü, EGCG'ye bağlı koruyucu etkilerin oluştuğu yönündedir.

GPX (glutatyon peroksidaz) içerisinde pek çok alttürü barındıran enzim ailesinin genel adı olup ilk kez 1957 yılında Gordon C. Mills tarafından tanımlanmıştır.(181-184) GPX hidrojen peroksitten suyun oluşumunu katalizleyerek hücreleri serbest radikal aracılı hasardan koruyan önemli bir antioksidan enzimdir.(şekil 2) (181-184)

Çalışmamızda reperfüzyondan 24 saat sonra flep dstalinde GPX düzeyleri ölçülmüş ve kontrol gruplarının 0-3-9-12. Saat GPX enzim düzeyleri deney grubu olguların GPX enzim düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **düşük** bulundu ( $p<0,05$ ). 6. Saat enzim düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ( $p>0,05$ ).

GPX enzim düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde; grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F:706,61 p:0,001  $p<0,05$ ), beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu (F:14950,23 p:0,001  $p<0,05$ ).

Deney ve kontrol grubu olguların GPX enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirme sonuçları incelendiğinde; kontrol grubu 0. ve 3. saat GPX enzim düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı

( $p>0,05$ ). Diğer tüm ikili karşılaştırmalar arasındaki değişimler istatistiksel olarak anlamlı bulundu ( $p<0,05$ ).

GPX enzim düzeyleri, çalışmanın geneline bakıldığı zaman EGCG verilen deney gruplarında istatistiksel olarak yüksek bulunmuş olup sadece 6 saat iskemi uygulanan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmamıştır. Bu durumun nedeni tam olarak anlaşılammış olsa da çalışma sırasındaki teknik bir hatadan kaynaklandığı düşünülmektedir. Ayrıca çalışmamızda belirleyici gruplar 9 ve 12 saat iskemi uygulanan gruplardır. Çünkü gerçek anlamda bu gruplarda reperfüzyon hasarı oluşmuştur. Çalışmamızda 0, 3 ve 6 saatlik iskemi periyodlarının kullanılmasının nedeni istatistiksel olarak, yukarıda da bahsedildiği gibi, sadece gruplar arasındaki enzim düzeylerinin karşılaştırılması değil enzim düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için tekrarlayan varyans analizinin, grupların zaman ile etkileşiminin ve enzim düzeylerinin zamana bağlı ölçümlerinin ikili olarak değerlendirilebilmesine imkan sağlayarak daha kesin istatistiksel sonuçlar elde etmeye çalışmaktır.

SOD ve GPX hücreleri serbest radikal aracılı hasardan koruyan önemli antioksidan enzimlerdir.(2) GPX enzim düzeylerinin de yüksek olarak ölçülmesi hücrelerin sadece süperoksit radikaline bağlı hasara karşı değil hidrojen peroksitine bağlı hasara karşı da korunduğunu göstermektedir. Çalışmamızda deney gruplarında kontrol gruplarına oranla SOD ve GPX enzim düzeylerinin daha yüksek saptanmış olması EGCG nin antioksidan etkisinin bir sonucu olarak değerlendirilmiştir.

TNF- $\alpha$ , inflamasyon sırasında primer olarak aktive olmuş makrofajlardan sentezlenen sitokin ailesine mensup polipeptid yapısında bir bileşiktir. İnflamasyon sırasında meydana gelen ateş gibi sistemik etkilerin yanısıra nötrofil agregasyonu ve aktivasyonu, nitrik oksit sentezi, fibroblast aktivasyonu, mezenkimal hücrelerden proteolitik enzimlerin salınımını arttırarak doku hasarı gibi pek çok önemli etkisi mevcuttur. (185)

İskemi – reperfüzyon hasarında nötrofil aracılı mekanizma çok önemli bir yere sahip olup TNF- $\alpha$  sentezinin blokajı doku hasarını azaltıcı etkinlik göstereceği ortadadır. Çalışmamızda, kontrol grubu olguların 0-3-6-9-12. saat TNF- $\alpha$  düzeyleri deney grubu olgularının TNF- $\alpha$  düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **yüksek** bulundu.( $p<0,05$ )

TNF- $\alpha$  değerlerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde; grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F:100,80 p:0,001 p<0,05), beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu (F:3166,33 p:0,001 p<0,05).

TNF- $\alpha$  düzeyinin kontrol gruplarında istatistiksel olarak daha yüksek olarak saptanmasının, EGCG verilen deney gruplarında nötrofil aracılı hasar karşı hücrelerin korunduğunun göstergesidir.

MDA reperfüzyon hasarında serbest radikallere bağlı oluşan membran lipit peroksidasyonunun göstergesidir.(73,188) Çalışmamızda deney grubu olguların 0-3-6-9-12. saat MDA düzeyleri kontrol grubu olguların 0-3-6-9-12. saat MDA düzeylerinden istatistiksel olarak anlamlı **düşük** bulundu (p<0,05).

MDA düzeylerinin deney ve kontrol gruplarındaki değişimleri için yapılan tekrarlayan ölçümlerde varyans analizinde; grupların zaman ile etkileşimi istatistiksel olarak anlamlı bulundu (F:2893,007 p:0,001 p<0,05) ve beş zaman grubu birbirinden istatistiksel olarak anlamlı farklı bulundu (F:97,434 p:0,001 p<0,05).

MDA düzeylerindeki bu farklılıklar EGCG'nin serbest radikal aracılı hücre hasarını engellediğinin göstergesidir.

Sonuç olarak, iskemi – reperfüzyon hasarı tıbbın pek çok dalını ilgilendiren ve altındaki patolojik mekanizmaların tam olarak açıklığa kavuşturulamadığı karmaşık bir süreçtir. Plastik Cerrahide serbest doku aktarımlarında, kompozit doku nakillerinde ve reimplantasyon uygulamalarında dikkate alınması gereken ciddi sorunlara yol açabilecek bir süreçtir.

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar yoğun bir şekilde devam etmekle birlikte uygun bir farmasötik ajan henüz geliştirilememiştir. Bu durumdan yola çıkarak EGCG'nin iskemi – reperfüzyon hasarına karşı olası koruyucu etkilerini sıçan epigastrik arter flebinde incelediğimiz çalışmamızda; parsiyel nekroz görülen 9 saatlik iskemi gruplarındaki nekroz oranları ile reperfüzyondan 24 saat sonra alınan doku biyopsilerindeki MDA, antioksidan enzimler SOD ve GPX düzeyleri ile inflamatuvar süreçlerde önemli rolü olan sitokin ailesinden TNF- $\alpha$  düzeyleri kontrol ve deney grupları arasında karşılaştırıldığında EGCG'nin reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu kanaatine varılmıştır.

## ÖZET

İskemi- reperfüzyon hasarına karşı yeşil çayın ana polifenol bileşiği olan epigallocatechin gallate'nin (EGCG) olası koruyucu etkilerini sıçan epigastrik arter flebi üzerinde inceledik.

Çalışmamızda 80 adet sıçan kullanılmış olup rastgele seçilen 40 tanesi deney ve 40 tanesi kontrol grubunu oluşturmuştur. Her bir grup kendi içerisinde farklı sürelerde ( 0, 3, 6, 9 ve 12 saat) iskemi uygulamak üzere rastgele beş alt gruba ayrıldı. Reperfüzyondan 30 dakika önce, 12 saat sonra ve devam eden 4 gün boyunca her gün intraperitoneal 100 µmol/kg EGCG, benzer şekilde kontrol gruplarına ise 2 cc steril izotonik enjekte edildi. 7. Gün enjeksiyon yapılmayıp fleplerin asetat üzerine çizimleri alındı.

Reperfüzyondan 24 saat sonra flep distalinden alınan dokularda SOD, GPX, TNF- $\alpha$  ve MDA düzeylerine ve nötrofil sayılarına bakıldı. SOD düzeyleri tüm kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük, MDA ve TNF- $\alpha$  düzeyleri ise tüm kontrol gruplarında istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksek saptandı. GPX ise 0, 3, 9 ve 12 saat iskemi uygulanan kontrol gruplarında deney gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük olarak saptandı. Nötrofil sayıları incelendiğinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık saptanmadı.

Reperfüzyondan sonra 7. günde fleplerde oluşan nekroz oranları incelendiğinde; 0, 3 ve 6 saat iskemi uygulanan gruplarda flep nekrozuna rastlanmadı. 12 saat iskemi uygulanan gruplarda ise tüm fleplerde total nekroz görüldü. Ancak 9 saat iskemi uygulanan fleplerde parsiyel nekroz oluştu ve deney gruplarında kontrol gruplarına oranla istatistiksel olarak anlamlı derecede düşük nekroz oranları elde edildi.

Yukarıdaki verilerin ışığında EGCG'nin cilt fleplerindeki iskemi – reperfüzyon hasarına karşı koruyucu etkilerinin olduğu kanaatine varıldı.

**Anahtar kelimeler: EGCG, iskemi, reperfüzyon, , yeşil çay.**

## **SUMMARY**

We have studied the possible protective effects of EGCG, main polyphenol compound of green tea, against the ischemia-reperfusion injury in the rat epigastric artery flap.

80 rats were used in our study. 40 rats were randomly selected for experimental groups and 40 rats were randomly selected for control groups. Each group randomly divided into five sub-groups to apply ischemia in different time intervals (0, 3, 6, 9 and 12 hours). 30 minutes prior to reperfusion 100  $\mu\text{mol} / \text{kg}$  of EGCG were injected intraperitoneally, this injection was repeated after 12 hours and continued for 4 days as daily injection. Similarly 2 ml of sterile saline were injected to the control groups. Flaps drawings were taken into acetates on seventh day without injection.

24 hours after reperfusion, SOD, GPX, MDA and TNF- $\alpha$  levels and neutrophil counts were measured in tissues taken from distal portions of the flap. SOD levels were statistically lower in all control groups, MDA and TNF- $\alpha$  levels were statistically higher in all control groups. Compared with the experimental groups, GPX levels were measured statistically lower in control groups in the 0, 3, 9 and 12 hours of ischemia. There was no statistically significant difference between groups in neutrophils counts.

Flap necrosis was examined on the seventh day after reperfusion; flap necrosis wasn't seen in 0, 3 and 6 hours of ischemia groups. Total necrosis were seen in all flaps in the 12 hours of ischemia groups. However, partial flap necrosis occurred in the 9 hours of ischemia groups and statistically lower rates of necrosis were obtained in experimental groups compared to the control groups.

The findings of our study showed that EGCG has protective effect against ischemia – reperfusion injury in the skin flaps.

**Key words: EGCG, green tea, ischemia, reperfusion.**

## 6. KAYNAKLAR

- 1- Vedder N.B. Flap physiology. In: Mathes SJ, Hentz VR. Mathes Plastic Surgery, 2nd edition Philadelphia, Saunders Elsevier Inc, vol:1, 483-506, 2006.
- 2- Mitchell R. N., Cotran R. S. Cell injury, cell death and adaptations. In: Robbins Basic Pathology, 7th edition Philadelphia, Saunders Elsevier Inc, 3 – 33, 2003.
- 3- Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on Ischemia-Reperfusion Injury for the Plastic Surgeon: 2011 Plast. Reconstr. Surg. 128: 685- 692, 2011
- 4- Ramesh E, Elanchezhian R, Sakthivel M, Jayakumar T, Senthil Kumar RS, Geraldine P, Thomas P. Epigallocatechin gallate improves serum lipid profile and erythrocyte and cardiac tissue antioxidant parameters in Wistar rats fed an atherogenic diet: Fundamental & Clinical Pharmacology. 22(3):275-284, 2008.
- 5- Katiyar SK, Elmets CA. Green tea polyphenolic antioxidants and skin photoprotection (Review): Int J Oncol. 18(6):1307-13, 2001.
- 6- Katiyar SK. Skin photoprotection by green tea: antioxidant and immunomodulatory effects Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord. 3(3):234-42. 2003
- 7- Hu C, Kitts DD. Evaluation of antioxidant activity of epigallocatechin gallate in biphasic model systems in vitro. Molecular & Cellular Biochemistry. 218(1-2):147-155, 2001.
- 8- Kim CY, Lee C, Park GH, Jang JH . Neuroprotective effect of epigallocatechin-3-gallate against [beta]-amyloid-induced oxidative and nitrosative cell death via augmentation of antioxidant defense capacity. Archives of Pharmacal Research. 32(6):869-881, 2009.
- 9- Gundimeda U, McNeill TH, Schiffman JE, Hinton DR, Gopalakrishna R. Green tea polyphenols potentiate the action of nerve growth factor to induce neuritogenesis: Possible role of reactive oxygen species. Journal of Neuroscience Research. 88(16):3644-3655, 2010
- 10- Xie T, Wang WP, Mao ZF, Qu ZZ, Luan SQ, Jia LJ, Kan MC. Effects of epigallocatechin-3-gallate on pentylentetrazole-induced kindling, cognitive impairment and oxidative stress in rats. Neurosci Lett. 16;516(2):237-41, 2012.
- 11- Brückner M, Westphal S, Domschke W, Kucharzik T, Lügering A. Green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate shows therapeutic antioxidative effects in a murine model of colitis. J Crohns Colitis. 6(2):226-35, 2012.
- 12- Sheng R, Gu ZL, Xie ML. Epigallocatechin gallate, the major component of polyphenols in green tea, inhibits telomere attrition mediated cardiomyocyte apoptosis in cardiac hypertrophy. Int J Cardiol. Oct 14, 2011.
- 13- Narayanan S, Srinivasan K, Ganapasam S. Epigallocatechin-3-gallate augments antioxidant activities and inhibits inflammation during bleomycin-induced experimental pulmonary fibrosis through Nrf2–Keap1 signaling. Pulmonary Pharmacology & Therapeutics 22(3): 221-236, 2009.
- 14- Cao G, Chen M, Song Q, Liu Y, Xie L, Han Y, Liu Z, Ji Y, Jiang Q. EGCG protects against UVB-induced apoptosis via oxidative stress and the JNK1/c-Jun pathway in ARPE19 cells. Mol Med Report. 5(1):54-9, 2012.
- 15- Leu JG, Chen SA, Chen HM, Wu WM, Hung CF, Yao YD, Tu CS, Liang YJ. The effects of gold nanoparticles in wound healing with antioxidant epigallocatechin gallate and  $\alpha$ -lipoic acid. Nanomedicine. Sep 9, 2011.
- 16- Wu YY, Li W, Xu Y, Jin EH, Tu YY. Evaluation of the antioxidant effects of four main theaflavin derivatives through chemiluminescence and DNA damage analyses. J Zhejiang Univ Sci B; 12(9):744-51, 2011.
- 17- Kim H, Sakamoto K. (-)-Epigallocatechin gallate suppresses adipocyte differentiation through the MEK/ERK and PI3K/Akt pathways. Cell Biol Int. 1;36(2):147-53, 2012
- 18- Abib RT, Peres KC, Barbosa AM, Peres TV, Bernardes A, Zimmermann LM, Quincozes-Santos A, Fiedler HD, Leal RB, Farina M, Gottfried C. Epigallocatechin-3-

- gallate protects rat brain mitochondria against cadmium-induced damage. *Food Chem Toxicol*; 49(10):2618-23, 2011.
- 19- Tsai PY, Ka SM, Chang JM, Chen HC, Shui HA, Li CY, Hua KF, Chang WL, Huang JJ, Yang SS, Chen A. Epigallocatechin-3-gallate prevents lupus nephritis development in mice via enhancing the Nrf2 antioxidant pathway and inhibiting NLRP3 inflammasome activation. *Free Radic Biol Med*. 1;51(3):744-54, 2011.
  - 20- Takagaki A, Otani S, Nanjo F. Antioxidative activity of microbial metabolites of (-)-epigallocatechin gallate produced in rat intestines. *Biosci Biotechnol Biochem*; 75(3):582-5. 2011
  - 21- Matsumoto Y, Kaihatsu K, Nishino K, Ogawa M, Kato N, Yamaguchi A. Antibacterial and antifungal activities of new acylated derivatives of epigallocatechin gallate. *Front Microbiol*. 3:53, 2012.
  - 22- Cho YS, Oh JJ, Oh KH. Synergistic anti-bacterial and proteomic effects of epigallocatechin gallate on clinical isolates of imipenem-resistant *Klebsiella pneumoniae*. *Phytomedicine*. 15;18(11), 2011.
  - 23- Gordon NC, Wareham DW. Antimicrobial activity of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against clinical isolates of *Stenotrophomonas maltophilia*. *Int J Antimicrob Agents*. Aug;36(2):129-31, 2010.
  - 24- Osterburg A, Gardner J, Hyon SH, Neely A, Babcock G. Highly antibiotic-resistant *Acinetobacter baumannii* clinical isolates are killed by the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG). *Clin Microbiol Infect*. 15(4):341-6, 2009.
  - 25- Han Y. Synergic anticandidal effect of epigallocatechin-O-gallate combined with amphotericin B in a murine model of disseminated candidiasis and its anticandidal mechanism. *Biol Pharm Bull*. 30(9):1693-6, 2007.
  - 26- Green tea catechins inhibit bacterial DNA gyrase by interaction with its ATP binding site. *J. Med Chem*. 25;50(2):264-71, 2007.
  - 27- Chen C, Qiu H, Gong J, Liu Q, Xiao H, Chen XW, Sun BL, Yang RG. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits the replication cycle of hepatitis C virus. *Arch Virol*. 11, Apr 2012.
  - 28- Isaacs CE, Xu W, Merz G, Hillier S, Rohan L, Wen GY. Digallate dimers of (-)-epigallocatechin gallate inactivate herpes simplex virus. *Antimicrob Agents Chemother*. Dec;55(12):5646-53, 2011.
  - 29- Williamson MP, McCormick TG, Nance CL, Shearer WT. Epigallocatechin gallate, the main polyphenol in green tea, binds to the T-cell receptor, CD4: Potential for HIV-1 therapy. *J Allergy Clin Immunol*. 118(6):1369-74, 2006.
  - 30- Zhang HS, Wu TC, Sang WW, Ruan Z. EGCG inhibits Tat-induced LTR transactivation: Role of Nrf2, AKT, AMPK signaling pathway. *Life Sci*. 22;90(19-20):747-54, 2012.
  - 31- Shin HY, Kim SH, Jeong HJ, et al. Epigallocatechin-3-gallate inhibits secretion of TNF- $\alpha$ , IL-6 and IL-8 through the attenuation of ERK and NF- $\kappa$ B in HMC-1 cells. *Int Arch Allergy Immunol*. 142:335-344, 2007.
  - 32- Katiyar S, Mukhtar H. Green tea polyphenol (2)-epigallocatechin-3-gallate treatment to mouse skin prevents UVB-induced infiltration of leukocytes, depletion of antigen-presenting cells, and oxidative stress. *J. Leukoc. Biol*. 69: 719-726, 2001.
  - 33- Klass BR, Branford OA, Grobbelaar AO, Rolfe KJ. The effect of epigallocatechin-3-gallate, a constituent of green tea, on transforming growth factor- $\beta$ 1-stimulated wound contraction. *Wound Rep Reg*. 18: 80-88, 2010.
  - 34- Joo SY, Song YA, Park YL, Myung E, Chung CY, Park KJ, Cho SB, Lee WS, Kim HS, Rew JS, Kim NS, Joo YE. Epigallocatechin-3-gallate Inhibits LPS-Induced NF- $\kappa$ B and MAPK Signaling Pathways in Bone Marrow-Derived Macrophages. *Gut Liver*. 6(2):188-96, 2012.

- 35- Roy S, Sannigrahi S, Vaddepalli RP, Ghosh B, Pusp P. A Novel Combination of Methotrexate and Epigallocatechin Attenuates the Overexpression of Pro-inflammatory Cartilage Cytokines and Modulates Antioxidant Status in Adjuvant Arthritic Rats. Inflammation. Mar 28, 2010.
- 36- Megan E. Cavet, Karen L. Harrington, Thomas R. Vollmer, Keith W. Ward, Jin-Zhong Zhang Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells. *Molecular Vision*. 17:533-542, 2011.
- 37- Ahn HY, Kim CH, Ha TS Epigallocatechin-3-gallate Regulates NADPH Oxidase Expression in Human Umbilical Vein Endothelial Cells Korean J Physiol Pharmacol Vol 14: 325 - 329, 2010.
- 38- Jiang J, Mo ZC, Yin K, Zhao GJ, Lv YC, Ouyang XP, Jiang ZS, Fu Y, Tang CK Epigallocatechin-3-gallate prevents TNF- $\alpha$ -induced NF- $\kappa$ B activation thereby upregulating ABCA1 via the Nrf2/Keap1 pathway in macrophage foam cells. *Int J Mol Med*. 29(5):946-56, 2012.
- 39- Akhtar N, Haqqi TM. Epigallocatechin-3-gallate suppresses the global interleukin-1beta-induced inflammatory response in human chondrocytes. *Arthritis Res Ther*. 17;13(3):R93, 2011.
- 40- Zheng Y, Toborek M, Hennig B. Epigallocatechin gallate-mediated protection against tumor necrosis factor- $\alpha$ -induced monocyte chemoattractant protein-1 expression is heme oxygenase-1 dependent. *Metabolism*. 59(10):1528-35, 2010.
- 41- Yoshino K, Miyase T, Sano M. Preventive effects of C-2 epimeric isomers of tea catechins on mouse type I allergy. *J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo)*. 56(3):211-5, 2010.
- 42- Inoue T, Suzuki Y, Ra C Epigallocatechin-3-gallate inhibits mast cell degranulation, leukotriene C4 secretion, and calcium influx via mitochondrial calcium dysfunction. *Free Radic Biol Med*. 15;49(4):632-40, 2010.
- 43- Melgarejo E, Medina MA, Sánchez-Jiménez F, Urdiales JL. Epigallocatechin gallate reduces human monocyte mobility and adhesion in vitro. *Br J Pharmacol*. 158(7):1705-12, 2009.
- 44- Kawai K, Tsuno NH, Kitayama J, Okaji Y, Yazawa K, Asakage M, Sasaki S, Watanabe T, Takahashi K, Nagawa H. Epigallocatechin gallate induces apoptosis of monocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 115(1):186-91, 2005.
- 45- Fujimura Y, Tachibana H, Maeda-Yamamoto M, Miyase T, Sano M, Yamada K. Antiallergic tea catechin, (-)-epigallocatechin-3-O-(3-O-methyl)-gallate, suppresses Fc $\epsilon$ RI expression in human basophilic KU812 cells. *J Agric Food Chem*. 25;50(20):5729-34; 2002.
- 46- Fujimura Y, Umeda D, Yano S, Maeda-Yamamoto M, Yamada K, Tachibana H. The 67kDa laminin receptor as a primary determinant of anti-allergic effects of O-methylated EGCG. *Biochem Biophys Res Commun*. 7;364(1):79-85, 2007.
- 47- Ren L, Yang HY, Choi HI, Chung KJ, Yang U, Lee IK, Kim HJ, Lee DS, Park BJ, Lee TH The role of peroxiredoxin V in (-)-epigallocatechin 3-gallate-induced multiple myeloma cell death. *Oncol Res*. 19(8-9):391-8, 2011.
- 48- Lim YC, Cha YY Epigallocatechin-3-gallate induces growth inhibition and apoptosis of human anaplastic thyroid carcinoma cells through suppression of EGFR/ERK pathway and cyclin B1/CDK1 complex. *J Surg Oncol*. 104(7):776-80, 2011.
- 49- Yan C, Yang J, Shen L, Chen X. Inhibitory effect of Epigallocatechin gallate on ovarian cancer cell proliferation associated with aquaporin 5 expression. *Arch Gynecol Obstet*. 285(2):459-67, 2012.
- 50- Selman SH, Keck RW A comparative study of the inhibiting effects of mitomycin C and polyphenolic catechins on tumor cell implantation/growth in a rat bladder tumor model. *J Urol*.186(2):702-6, 2011.



- 51- Stearns ME, Wang M Synergistic Effects of the Green Tea Extract Epigallocatechin-3-gallate and Taxane in Eradication of Malignant Human Prostate Tumors. *Transl Oncol.* 4(3):147-56, 2011.
- 52- Liu X, Zhang DY, Zhang W, Zhao X, Yuan C, Ye F. The effect of green tea extract and EGCG on the signaling network in squamous cell carcinoma. *Nutr Cancer.*63(3):466-75, 2011.
- 53- Stearns ME, Amatangelo MD, Varma D, Sell C, Goodyear SM. Combination therapy with epigallocatechin-3-gallate and doxorubicin in human prostate tumor modeling studies: inhibition of metastatic tumor growth in severe combined immunodeficiency mice. *Am J Pathol.* 177(6):3169-79, 2010.
- 54- Chen PN, Chu SC, Kuo WH, Chou MY, Lin JK, Hsieh YS Epigallocatechin-3 gallate inhibits invasion, epithelial-mesenchymal transition, and tumor growth in oral cancer cells. *J Agric Food Chem.* 27;59(8):3836-44, 2011.
- 55- Rao SD, Pagidas K. Epigallocatechin-3-gallate, a natural polyphenol, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in human ovarian cancer cells. *Anticancer Res.* 30(7):2519-23, 2010.
- 56- Koh YW, Choi EC, Kang SU, Hwang HS, Lee MH, Pyun J, Park R, Lee Y, Kim CH. Green tea (-)-epigallocatechin-3-gallate inhibits HGF-induced progression in oral cavity cancer through suppression of HGF/c-Met. *J Nutr Biochem.* 22(11):1074-83, 2011.
- 57- Masuda M, Wakasaki T, Toh S, Shimizu M, Adachi S. Chemoprevention of Head and Neck Cancer by Green Tea Extract: EGCG-The Role of EGFR Signaling and "Lipid Raft". *J Oncol.* 2011:540148, 2011.
- 58- Kwak IH, Shin YH, Kim M, Cha HY, Nam HJ, Lee BS, Chaudhary SC, Pai KS, Lee JH Epigallocatechin -3-gallate inhibits paracrine and autocrine hepatocyte growth factor/scatter factor-induced tumor cell migration and invasion. *Exp Mol Med.* 28;43(2):111-20, 2011
- 59- Nandakumar V, Vaid M, Katiyar SK. (-)-Epigallocatechin-3-gallate reactivates silenced tumor suppressor genes, Cip1/p21 and p16INK4a, by reducing DNA methylation and increasing histones acetylation in human skin cancer cells. *Carcinogenesis.* 32(4):537-44, 2011.
- 60- Rocha S, Generalov R, Pereira Mdo C, Peres I, Juzenas P, Coelho MA Epigallocatechin gallate-loaded polysaccharide nanoparticles for prostate cancer chemoprevention. *Nanomedicine (Lond).* 6(1):79-87, 2011.
- 61- Megan E. Cavet, Karen L. Harrington, Thomas R. Vollmer, Keith W. Ward, Jin-Zhong Zhang. Anti-inflammatory and anti-oxidative effects of the green tea polyphenol epigallocatechin gallate in human corneal epithelial cells *Molecular Vision* 17:533-542, 2011.
- 62- Kim CJ, Kim JM, Lee SR, Jang YH, Kim JH, Chun KJ Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate targeting myocardial reperfusion limits infarct size and improves cardiac function *Korean J Anesthesiol.* 58(2):169-75, 2010.
- 63- Piao CS, Kim DS, Ha KC, Kim HR, Chae HJ, Chae SW. The Protective Effect of Epigallocatechin-3 Gallate on Ischemia/Reperfusion Injury in Isolated Rat Hearts: An ex vivo Approach. *Korean J Physiol Pharmacol.* 15(5):259-66, 2011.
- 64- Song DK, Jang Y, Kim JH, Chun KJ, Lee D, Xu Z. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate during ischemia limits infarct size via mitochondrial K(ATP) channel activation in isolated rat hearts. *J Korean Med Sci.* 25(3):380-6, 2010.
- 65- Darra E, Shoji K, Mariotto S, Suzuki H. Protective effect of epigallocatechin-3-gallate on ischemia/reperfusion-induced injuries in the heart: STAT1 silencing flavonoid. *Genes Nutr.* 2(3):307-10, 2007.
- 66- Potenza MA, Marasciulo FL, Tarquinio M, Tiravanti E, Colantuono G, Federici A, Kim JA, Quon MJ, Montagnani M. EGCG, a green tea polyphenol, improves endothelial function and insulin sensitivity, reduces blood pressure, and protects against myocardial I/R injury in SHR. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 292(5):E1378-87, 2007.

- 67- Aneja R, Hake PW, Burroughs TJ, Denenberg AG, Wong HR, Zingarelli B. Epigallocatechin, a green tea polyphenol, attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats. *Mol Med.* 10(1-6):55-62; Jan-Jun, 2004.
- 68- Townsend PA, Scarabelli TM, Pasini E, Gitti G, Menegazzi M, Suzuki H, Knight RA, Latchman DS, Stephanou A. Epigallocatechin-3-gallate inhibits STAT-1 activation and protects cardiac myocytes from ischemia/reperfusion-induced apoptosis. *FASEB J.* 18(13):1621-3, 2004.
- 69- Kakuta Y, Okumi M, Isaka Y, Tsutahara K, Abe T, Yazawa K, Ichimaru N, Matsumura K, Hyon SH, Takahara S, Nonomura N. Epigallocatechin-3-gallate protects kidneys from ischemia reperfusion injury by HO-1 upregulation and inhibition of macrophage infiltration. *Transpl Int.* 24(5):514-22, 2011.
- 70- Jang YH, Lee YC, Park NH, Shin HY, Mun KC, Choi MS, Lee MY, Kim AR, Kim JM, Lee SR, Park HR. Polyphenol (-)-epigallocatechin gallate protection from ischemia/reperfusion-induced renal injury in normotensive and hypertensive rats. *Transplant Proc.* 38(7):2190-4, 2006.
- 71- Al-Maghrebi M, Renno WM, Al-Ajmi N. Epigallocatechin-3-gallate inhibits apoptosis and protects testicular seminiferous tubules from ischemia/reperfusion-induced inflammation. *Biochem Biophys Res Commun.* 6;420(2):434-9, 2012.
- 72- Giakoustidis AE, Giakoustidis DE, Koliakou K, Kaldrymidou E, Iliadis S, Antoniadis N, Kontos N, Papanikolaou V, Papageorgiou G, Atmatzidis K, Takoudas D. Inhibition of intestinal ischemia/reperfusion induced apoptosis and necrosis via down-regulation of the NF- $\kappa$ B, c-Jun and caspase-3 expression by epigallocatechin-3-gallate administration. *Free Radic Res.* 42(2):180-8, 2008.
- 73- Giakoustidis DE, Giakoustidis AE, Iliadis S, Koliakou K, Antoniadis N, Kontos N, Papanikolaou V, Papageorgiou G, Kaldrymidou E, Takoudas D. Attenuation of liver ischemia/reperfusion induced apoptosis by epigallocatechin-3-gallate via down-regulation of NF- $\kappa$ B and c-Jun expression. *J Surg Res.* 159(2):720-8, 2010.
- 74- Fiorini RN, Donovan JL, Rodwell D, Evans Z, Cheng G, May HD, Milliken CE, Markowitz JS, Campbell C, Haines JK, Schmidt MG, Chavin KD. Short-term administration of (-)-epigallocatechin gallate reduces hepatic steatosis and protects against warm hepatic ischemia/reperfusion injury in steatotic mice. *Liver Transpl.* 11(3):298-308, 2005.
- 75- Peng PH, Ko ML, Chen CF. Epigallocatechin-3-gallate reduces retinal ischemia/reperfusion injury by attenuating neuronal nitric oxide synthase expression and activity. *Exp Eye Res.* 86(4):637-46, 2008.
- 76- Zhang B, Safa R, Rusciano D, Osborne NN. Epigallocatechin gallate, an active ingredient from green tea, attenuates damaging influences to the retina caused by ischemia/reperfusion. *Brain Res.* 23;1159:40-53, 2007.
- 77- Daniel RK, Kerrigan CL: Principal and physiology of skin flap surgery. In McCarthy JG, ed: *Plastic Surgery*. Philadelphia, WB Saunders, 275-328, 1990,
- 78- Mathes SJ, Levine J. Muscle Flaps and Their Blood Supply. In Thorne CH, ed-in-chief: *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 42-52. 2007
- 79- Taylor GI, Corlett RJ, Dhar SC, Ashton MW. The anatomical (angiosome) and clinical territories of cutaneous perforating arteries: development of the concept and designing safe flaps. *Plast Reconstr Surg.* 127(4):1447-59, 2011.
- 80- Taylor GI, Minabe T. The angiosomes of the mammals and other vertebrates. *Plast Reconstr. Surg.* 89:181-215, 1992.
- 81- Inoue Y, Taylor GI. The angiosomes of the forearm: anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr. Surg.* 98: 195-210, 1996.
- 82- Taylor GI, Pan WR. The angiosomes of the leg: anatomic study and clinical implications. *Plast. Reconstr. Surg.* 102: 599-616, 1998.

- 83- Houseman ND, Taylor GI, Pan WR . The angiosomes of the head and neck: anatomic study and clinical implications. *Plast Reconstr. Surg.* 105: 2287-2313, 2000.
- 84- Taylor GI, Corlett RJ, Dhar SC, Ashton MW. The anatomical (angiosome) and clinical territories of cutaneous perforating arteries: development of the concept and designing safe flaps. *Plast Reconstr Surg* ;127(4):1447-59, 2011.
- 85- Taylor GI, The blood supply of the skin. In Thorne CH, ed-in-chief: *Grabb and Smith's Plastic Surgery*, 6th edition. Lippincott Williams & Wilkins, 33-42, 2007.
- 86- Fujino T. Contribution of the axial and perforator vasculature to circulation in flaps. *Plast Reconstr. Surg.* 39: 125-137, 1967.
- 87- Gatti JE, LaRossa D, Neff SR, Silverman DG. Altered skin flap survival and fluorescein kinetics with hemodilution. *Surgery.* 92: 200-205, 1982.
- 88- Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps' triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. *Plast Reconstr Surg.*104(3):730-7, 1999.
- 89- Palmer B, Jurell G, Norberg KA. The blood flow in experimental skin flaps in rats studied by means of the 133 xenon clearance method. *Scand J Plast Reconstr Surg.* 6(1):6-12, 1972.
- 90- Nathanson SE, Jackson RT. Blood flow measurements in skin flaps. *Arch Otolaryngol.* Jun;101(6):354-7, 1975.
- 91- Kerrigan CL, Daniel RK. Skin flap research: a candid view. *Ann Plast Surg.* 13(5):383-7, 1984.
- 92- Kerrigan CL, Daniel RK. Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg.* 71(4):519-24, 1983.
- 93- Reinisch JF. The pathophysiology of skin flap circulation. The delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 54(5):585-98, 1974.
- 94- Kerrigan CL. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 72(6):766-77, 1983.
- 95- Sasaki GH, Pang CY. Pathophysiology of skin flaps raised on expanded pig skin. *Plast Reconstr Surg.* 74(1):59-67, 1984.
- 96- 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.
- 97- Khiabani KT, Kerrigan CL. Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: implications for salvage regimens. *Plast Reconstr Surg.* 109(1):220-7, 2002.
- 98- Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg.* 93(2):375-85, 1994.
- 99- Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg.* 93(2):366-74, 1994.
- 100- Angel MF, Mellow CG, Knight KR, O'Brien BM Secondary ischemia time in rodents: contrasting complete pedicle interruption with venous obstruction . *Plast Reconstr Surg.* 85(5):789-93, 1990.
- 101- Hauge EM, Balling E, Hartmund T, Hjortdal VE. Secondary ischemia caused by venous or arterial occlusion shows differential effects on myocutaneous island flap survival and muscle ATP levels. *Plast Reconstr Surg.* 99(3):825-33, 1997.
- 102- Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg.* 93(7):1485-95, 1994.
- 103- Fearon JA, Cuadros CL, May JW Jr. Flap failure after microvascular free-tissue transfer: the fate of a second attempt. *Plast Reconstr Surg.* 86(4):746-51, 1990.
- 104- Suominen S, Asko-Seljavaara S. Free flap failures. *Microsurgery.* 16(6):396-9, 1995.
- 105- Cohen BE, Harmon CS, Phizackerley PJ. Glucose metabolism in experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 71(1):79-86, 1983

- 106-Im MJ, Su CT, Hoopes JE, Anthenelli RM Skin-flap metabolism in rats: oxygen consumption and lactate production. *Plast Reconstr Surg.* 71(5):685-8, 1983.
- 107-Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg.* 198(1):87-90, 1983.
- 108-Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg.* 201(3):357-9, 1985.
- 109-Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW. Free radicals: basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg.* 79(6):990-7, 1987.
- 110-de With MC, Haug SJ, Brigitte van der Heijden EP, Segal SS. Ischemia-reperfusion impairs ascending vasodilation in feed arteries of hamster skeletal muscle. *Microcirculation.* 12: 551–561, 2005.
- 111-Wang WZ, Fang XH, Stepheson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Acute microvascular action of vascular endothelial growth factor in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 115:1355–1365, 2005.
- 112-Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. Ischemia/reperfusion-induced necrosis and apoptosis in the cells isolated from rat skeletal muscle. *J Orthop Res.* 26:351–356, 2008
- 113-Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Khiabani KT, Zamboni WA. I/R-induced apoptotic endothelial cells isolated from rat skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg.* 123(Suppl): 131s–138s, 2009.
- 114-Pradka SP, Ong YS, Zhang Y, et al. Increased signs of acute rejection with ischemic time in a rat musculocutaneous allotransplant model. *Transplant Proc.* 41:531–536, 2009.
- 115-Aravindan N, Williams MT, Riedel BJ, Shaw AD. Transcriptional responses of rat skeletal muscle following hypoxiareoxygenation and near ischaemia-reperfusion. *Acta Physiol Scand.* 183:367–377, 2005.
- 116-Hsieh CH, Jeng JC, Jeng SF, et al. MicroRNA profiling in ischemic injury of the gracilis muscle in rats. *BMC Musculoskelet Disord.* 11:123, 2010.
- 117-Iwata A, Morgan-Stevenson V, Schwartz B, et al. Extracellular BCL2 proteins are danger-associated molecular patterns that reduce tissue damage in murine models of ischemia-reperfusion injury. *PLoS One.* 5:e9103, 2010.
- 118-Crawford RS, Albadawi H, Atkins MD, et al. Postischemic treatment with ethyl pyruvate prevents adenosine triphosphate depletion, ameliorates inflammation, and decreases thrombosis in a murine model of hind-limb ischemia and reperfusion. *J Trauma* 70:103–110; discussion 110, 2011.
- 119-Lakyova' L, Toporcer T, Tomec'kova' V, Sabo J, Radonak J. Low-level laser therapy for protection against skeletal muscle damage after ischemia-reperfusion injury in rat hindlimbs. *Lasers Surg Med.* 42:665–672, 2010.
- 120-Henderson PW, Singh SP, Weinstein AL, et al. Therapeutic metabolic inhibition: Hydrogen sulfide significantly mitigates skeletal muscle ischemia reperfusion injury in vitro and in vivo. *Plast Reconstr Surg.* 126:1890–1898, 2010.
- 121-Crawford RS, Albadawi H, Atkins MD, et al. Postischemic poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) inhibition reduces ischemia reperfusion injury in a hind-limb ischemia model. *Surgery* 148:110–118, 2010.
- 122-Murphy AD, McCormack MC, Bichara DA, et al. Poloxamer 188 protects against ischemia-reperfusion injury in a murine hind-limb model. *Plast Reconstr Surg.* 125:1651–1660, 2010.
- 123-Ergün Y, Oksüz H, Atli Y, Kilinc, M, Darendeli S. Ischemia reperfusion injury in skeletal muscle: Comparison of the effects of subanesthetic doses of ketamine, propofol, and etomidate. *J Surg Res.* 159:e1–e10, 2010.

- 124-Zheng J, Wang R, Zambraski E, Wu D, Jacobson KA, Liang BT. Protective roles of adenosine A1, A2A, and A3 receptors in skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H3685–H3691, 2007.
- 125-Park JW, Qi WN, Cai Y, Urbaniak JR, Chen LE. Proteasome inhibitor attenuates skeletal muscle reperfusion injury by blocking the pathway of nuclear factor-kappaB activation. *Plast Reconstr Surg.* 120:1808–1818, 2007.
- 126-Mamedova LK, Wang R, Besada P, Liang BT, Jacobson KA. Attenuation of apoptosis in vitro and ischemia/reperfusion injury in vivo in mouse skeletal muscle by P2Y6 receptor activation. *Pharmacol Res.* 58:232–239, 2008.
- 127-Dillon JP, Laing AJ, Chandler JR, et al. Hypertonic saline reduces skeletal muscle injury and associated remote organ injury following ischemia reperfusion injury. *Acta Orthop.* 79:703–707, 2008.
- 128-McAllister SE, Moses MA, Jindal K, et al. Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange inhibitor cariporide attenuates skeletal muscle infarction when administered before ischemia or reperfusion. *J Appl Physiol.* 106:20–28, 2009.
- 129-Karaaslan O, Ulusoy MG, Kankaya Y, et al. Protective effect of grape seed extract against ischaemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 63:705–710, 2010.
- 130-Eichhorn W, Blake FA, Pohlenz P, Gehrke G, Schmelzle R, Heiland M. Conditioning of myocutaneous flaps. *J Craniomaxillofac Surg.* 37:196–200, 2009. Hightower CM, Intaglietta M. The use of diagnostic frequency continuous ultrasound to improve microcirculatory function after ischemia-reperfusion injury. *Microcirculation* 14:571–582, 2007.
- 131-Hsieh YH, Huang SS, Wei FC, Hung LM. Resveratrol attenuates ischemia-reperfusion–induced leukocyte– endothelial cell adhesive interactions and prolongs allograft survival across the MHC barrier. *Circ J.* 71:423–428, 2007.
- 132-Arato´ E, Kürthy M, Sinay L, et al. Effect of vitamin E on reperfusion injuries during reconstructive vascular operations on lower limbs. *Clin Hemorheol Microcirc.* 44:125, 2010.
- 133-Tatlidede SH, Murphy AD, McCormack MC, et al. Improved survival of murine island skin flaps by prevention of reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 123:1431–1439, 2009.
- 134-Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, et al. Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 293:H274–H283, 2007.
- 135-Ward R, Souder N, Stahl D, et al. The role of nitric oxide synthase and heme oxygenase in the protective effect of hypothermia in ischemia-reperfusion injury. *J Bone Joint Surg Am.* 91:2637–2645, 2009.
- 136-Zimiani K, Guarnier FA, Miranda HC, Watanabe MA, Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 13:196–203, 2005.
- 137-Vedder NB, Winn RK, Rice CL, et al. A monoclonal antibody to the adherence-promoting leukocyte glycoprotein, CD18, reduces organ injury and improves survival form hemorrhagic shock and resuscitation in rabbits. *J Clin Invest.* 81:939-944, 1988.
- 138-Sharar SR, Mihelcic DD, Han KT, Harlan JM, Winn RK. Ischemia reperfusion injury in the rabbit ear is reduced by both immediate and delayed CD18 leukocyte adherence blockade. *J Immunol.* 1;153(5):2234-8, 1994.
- 139-Mihelcic D, Schleiffenbaum B, Tedder TF, Sharar SR, Harlan JM, Winn RK. Inhibition of leukocyte L-selectin function with a monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *Blood.* 1;84(7):2322-8, 1994.
- 140-Winn RK, Paulson JC, Harlan JM. A monoclonal antibody to P-selectin ameliorates injury associated with hemorrhagic shock in rabbits. *Am J Physiol.* 267(6 Pt 2):H2391-7, 1994.

- 141-Stotland MA, Kerrigan CL E- and L-selectin adhesion molecules in musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 99(7):2010-20, 1997.
- 142-Cetin C, Köse AA, Aral E, Colak O, Erçel C, Karabağlı Y, Alataş O, Eker A. Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg.* 47(5):540-6, 2001.
- 143-Dillon JP, Laing AJ, Chandler JR, Wang JH, McGuinness A, Redmond HP. Pravastatin attenuates tourniquet-induced skeletal muscle ischemia reperfusion injury. *Acta Orthop.* 77:27-32, 2006.
- 144-Cowled PA, Khanna A, Laws PE, Field JB, Varelias A, Fitridge RA. Statins inhibit neutrophil infiltration in skeletal muscle reperfusion injury. *J Surg Res.* 141:267-276, 2007.
- 145-Khiabani KT, Bellister SA, Skaggs SS, et al. Reperfusion induced neutrophil CD18 polarization: Effect of hyperbaric oxygen. *J Surg Res.* 150:11-16, 2008.
- 146-Jones SR, Carpin KM, Woodward SM, et al. Hyperbaric oxygen inhibits ischemia-reperfusion-induced neutrophil CD18 polarization by a nitric oxide mechanism. *Plast Reconstr Surg.* 126:403-411, 2010.
- 147-Thom SR. Hyperbaric oxygen: Its mechanisms and efficacy. *Plast Reconstr Surg.* 127(Suppl):131S-141S, 2011.
- 148-Huang SS, Wei FC, Hung LM. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte-endothelial cell interactions: Role of nitric oxide and protein kinase C. *Circ J.* 70:1070-1075, 2006.
- 149-Schoen M, Rotter R, Gierer P, et al. Ischemic preconditioning prevents skeletal muscle tissue injury, but not nerve lesion upon tourniquet-induced ischemia. *J Trauma* 63:788-797, 2007.
- 150-Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG Jr. Ischemic preconditioning of skeletal muscle mitigates remote injury and mortality. *J Surg Res.* 148:24-30, 2008.
- 151-McAllister SE, Ashrafpour H, Cahoon N, et al. Postconditioning for salvage of ischemic skeletal muscle from reperfusion injury: Efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 295:R681-R689, 2008.
- 152-Tsubota H, Marui A, Esaki J, Bir SC, Ikeda T, Sakata R. Remote postconditioning may attenuate ischaemia-reperfusion injury in the murine hindlimb through adenosine receptor activation. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 40:804-809, 2010.
- 153-Eberlin KR, McCormack MC, Nguyen JT, Tatlidede HS, Randolph MA, Austen WG Jr. Sequential limb ischemia demonstrates remote postconditioning protection of murine skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg.* 123(Suppl):8S-16S, 2009.
- 154-Tran TP, Tu H, Pipinos II, Muelleman RL, Albadawi H, Li YL. Tourniquet-induced acute ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscles: Involvement of superoxide. *Eur J Pharmacol.* 650:328-334, 2011.
- 155-Bolcal C, Yildirim V, Doganci S, et al. Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury. *J Surg Res.* 139:274-279, 2007.
- 156-Ozyurt H, Ozyurt B, Koca K, Ozgocmen S. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) protects rat skeletal muscle against ischemia-reperfusion-induced oxidative stress. *Vascul Pharmacol.* 47:108-112, 2007.
- 157-Neumayer C., Fu'gl A, Nanobashvili J., et al. Combined enzymatic and antioxidative treatment reduces ischemia-reperfusion injury in rabbit skeletal muscle. *J Surg Res.* 133:150-158, 2006.
- 158-Park JW., Qi WN., Cai Y., et al. Skeletal muscle reperfusion injury is enhanced in extracellular superoxide dismutase knockout mouse. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 289:H181-H187, 2005.
- 159-Kingston R., Kearns S., Kelly C., Murray P. Effects of systemic and regional taurine on skeletal muscle function following ischaemia-reperfusion injury. *J Orthop Res.* 23:310-314, 2005.

- 160-Atahan E, Ergun Y, Belge Kurutas E, Cetinus E, Guney Ergun U. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle is attenuated by zinc aspartate. *J Surg Res.* 137:109–116, 2007.
- 161-Wang WZ, Fang XH, Stephenson LL, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Microcirculatory effects of melatonin in rat skeletal muscle after prolonged ischemia. *J Pineal Res.* 39:57–65, 2005.
- 162-Erkanli K., Kayalar N., Erkanli G., Ercan F., Sener G., Kirali K. Melatonin protects against ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Pineal Res.* 39:238–242, 2005.
- 163-Finseth F., Cutting C., An experimental neurovascular island skin flap for the study of the delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg.* 61:412, 1978.
- 164-Petry J.J, Wortham K.A, The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. *Plast Reconstr Surg.* Sep;74(3):410-414, 1984.
- 165-Akyürek M., Kayıkçıoğlu A., Şafak T. ve ark: The arteriovenous crossflow flap of the rat. *Plast Reconstr Surg.* Jun;101(7):2012-2013, 1998.
- 166-Dunn R.M., Mancoll J.: Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg.* Aug;90(2):319-328, 1992
- 167-Bayramiçli M., Yılmaz B., Numanoğlu A.: Modified protective rat vest. *Plast Reconstr Surg.* 101:859, 1998
- 168-Hoşnuter M., Babuççu O., Kargı E., Altınyazar C.: Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg.* 50(4):398-402, 2003.
- 169-Maldonado C., Stadelmann W.K., Ramirez S. ve ark: Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid A. *Plast Reconstr Surg.* 111(1):267-274, 2003.
- 170-Zahir K.S., Syed S.A., Zink J.R. ve ark: Ischemic preconditioning improves the survival of skin and myocutaneous flap in a rat model. *Plast Reconstr Surg.* Jul;102(1):140-150, 1998.
- 171-Büttemeyer R, Philipp AW, Schlenzka L, Mall JW, Beissenhirtz M, Lisdat F. Epigallocatechin gallate can significantly decrease free oxygen radicals in the reperfusion injury in vivo. *Transplant Proc.* 2003 Dec;35(8):3116-20.
- 172-Klein MB, Chan PH, Chang J. Protective effects of superoxide dismutase against ischemia-reperfusion injury: development and application of a transgenic animal model. *Plast Reconstr Surg.* 111(1):251-5, 2003.
- 173-Tosa Y, Lee WP, Kollias N, Randolph MA, May JW Jr. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects skin flaps against ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1998 101(6):1586-94, 1998.
- 174-Gürel A., Armutçu F., Hoşnuter M., Unalacak M., Kargı E., Altınyazar C. Caffeic Acid Phenethyl Ester Improves Oxidative Organ Damage in Rat Model of Thermal Trauma. *Physiol. Res.* 53: 675-682, 2004.
- 175-McCord JM, Fridovich I "Superoxide dismutase: the first twenty years (1968-1988)". *Free Radic. Biol. Med.* 5 (5–6): 363–9, 1988.
- 176-Elchuri S, Oberley TD, Qi W, Eisenstein RS, Jackson Roberts L, Van Remmen H, Epstein CJ, Huang TT. CuZnSOD deficiency leads to persistent and widespread oxidative damage and hepatocarcinogenesis later in life. *Oncogene* 24 (3): 367–80, 2005.
- 177-Li Y, Huang TT, Carlson EJ, Melov S, Ursell PC, Olson JL, Noble LJ, Yoshimura MP, Berger C, Chan PH, Wallace DC, Epstein CJ. "Dilated cardiomyopathy and neonatal lethality in mutant mice lacking manganese superoxide dismutase". *Nat. Genet.* 11 (4): 376–81, 1995.
- 178-Gongora, Maria C.; Qin Z, Laude K, Kim HW, McCann L, Folz JR, Dikalov S, Fukai T, Harrison DG. Role of extracellular superoxide dismutase in hypertension. *Hypertension* 48 (3): 473–81, 2006.

- 179-Milani P, Gagliardi S, Cova E, Cereda C. SOD1 Transcriptional and Posttranscriptional Regulation and Its Potential Implications in ALS. *Neurol Res Int.* article ID: 458427, 9 sayfa, 2011.
- 180-Deng HX, Hentati A, Tainer JA, Iqbal Z, Cayabyab A, Hung WY, Getzoff ED, Hu P et al. Amyotrophic lateral sclerosis and structural defects in Cu,Zn superoxide dismutase. *Science.* 261 (5124): 1047–5, 1993.
- 181-Nakagawa Y Role of mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) as an antiapoptotic factor. *Biol. Pharm. Bull.* 27 (7): 956–60, 2005.
- 182-Kiss C, Li J, Szeles A, Gizatullin RZ, Kashuba VI, Lushnikova T, Protopopov AI, Kelve M, Kiss H, Kholodnyuk ID, Imreh S, Klein G, Zabarovskiy ER. Assignment of the ARHA and GPX1 genes to human chromosome bands 3p21.3 by in situ hybridization and with somatic cell hybrids. *Cytogenet Cell Genet* 79 (3–4): 228–30, 1998.
- 183-Kelner MJ, Bagnell RD, Montoya MA, Lanham KA. Structural organization of the human gastrointestinal glutathione peroxidase (GPX2) promoter and 3'-nontranscribed region: transcriptional response to exogenous redox agents. *Gene* 248 (1-2): 109–16, 2000.
- 184-MILLS GC. Hemoglobin catabolism. I. Glutathione peroxidase, an erythrocyte enzyme which protects hemoglobin from oxidative breakdown. *J. Biol. Chem.* 229 (1): 189–97, 1957.
- 185-Mitchell R. N., Cotran R. S. Acute and Chronic Inflammation. In: Robbins Basic Pathology, 7th edition Philadelphia, Saunders Elsevier Inc, 33- 61, 2003.
- 186-Woolliams JA,Wiener G, Anderson PH, McMurray CH. Variation in the activities of glutathione peroxidase and uperoxide dismutase and in the concentration of copper in the blood various breed crosses of sheep. *Res Vet Sci.* 34:69–77, 1983.
- 187-Paglia DE, Valentine WN. Studies on the quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med.* 70:158–69, 1967.
- 188- Drapper HH., Hadley M. Malondialdehyde determination as index of lipid peroxidation. *Methods Enzymol.* 186:421-431,1990