



**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİM DALI**

**RAT ABDOMİNAL EPİGASTRİK FLEBİNDE**  
**DİOSMİN + HESPERİDİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON**  
**HASARINA ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Selçuk YAZAN**

**KAYSERİ-2015**



**T.C.**  
**ERCIYES ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**  
**PLASTİK REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİM DALI**

**RAT ABDOMİNAL EPİGASTRİK FLEBİNDE**  
**DİOSMİN + HESPERİDİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON**  
**HASARINA ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**Dr. Selçuk YAZAN**

**Danışman**  
**Prof. Dr. Galip Kemali GÜNAY**

**KAYSERİ-2015**

## TEŞEKKÜR

Tezimin hazırlanmasındaki katkılarından dolayı Anabilim Dalı Başkanımız Prof. Dr. Galip Kemali GÜNAY başta olmak üzere, Anabilim Dalı Öğretim Üyelerimiz Prof. Dr. Atilla ÇORUH, Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN, Doç. Dr. Teoman ESKİTAŞÇIOĞLU, Öğr. Gör. Dr. Cemal Alper KEMALOĞLU' na,

Patoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Prof. Dr. Özlem CANÖZ ve Biyokimya Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Dr.Recep SARAYMEN' e,

Birlikte çalışmaktan keyif aldığım arkadaşlarım Dr.Fatih KILIÇ, Dr. Ömer Faruk ÜNVERDİ, Dr.Mehmet SEVERCAN, Dr. Sercan YÜCEL, Dr. Ahmet AYDIN, Dr. Emre ÖZENALP, Dr. Hakan ÖZOCAK, Dr. İlknur ORHAN' a,

Ameliyathanemizin güzel insanları Ümit GÜLTEKİN, Nejdet GÖKSU, Arife CİVAŞ' a

Servisimizin değerli hemşireleri Fatma KIRIKTAŞ, Hanım ILGIN, Ayşe SAKA Gonca ALTUN, Derya ÖZPOLAT, Naciye NARİN'e

Polikliniğimizin çok çalışkan hemşireleri Reyhan HARPUTLUOĞLU, Serap BAYKAN'a

Sekreterlerimiz Habibe ÇETİNKAYA, Leyla ŞAHİNER ve Tayfun KARABULUT' a

Hayatımın her döneminde her an varlıklarıyla ve destekleriyle bana büyük huzur ve mutluluk veren Annem Huri YAZAN, Babam Ali YAZAN, Kız Kardeşlerim Funda BİLGE ve Hülya YAZAN, Dayım İlyas DOĞAN' a

Sevgili ruh eşim, ilk ve son aşkım Derya YAZAN' a

Varlığı yaşama sevincim olan küçük adam Ayaz Batuhan YAZAN'a

**TEŞEKKÜR EDERİM...**

**Selçuk YAZAN,**

**Nisan 2015, KAYSERİ**

# İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR .....	i
İÇİNDEKİLER .....	ii
KISALTMALAR .....	v
TABLolar LİSTESİ.....	vi
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	vii
GRAFİK LİSTESİ .....	viii
ÖZET.....	ix
ABSTRACT .....	xi
1. GİRİŞ VE AMAÇ .....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI:.....	4
2.1.1. Serbest radikaller .....	6
2.1.2 Polimorf nüveli lökositler (PMNL) .....	8
2.1.3. Komplemanın rolü .....	11
2.1.4. Endotel hücrelerinin rolü.....	12
2.2. FLEP KAN AKIMININ DÜZENLENMESİ.....	13
2.3. FLEP KAYBI VE İSKEMİ –REPERFÜZYON HASARI: .....	15
2.4.İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI TEDAVİ YAKLAŞIMLARI .....	17
2.4.1. Hipotermi ve intraarteriyel yıkama.....	18
2.4.2. İskemik Önkoşullama ve Geciktirme (Delay) Fenomeni .....	18
2.4.3. Antitrombotik ajanlar .....	21
2.4.4. Nitrik oksit .....	22
2.4.5. Lökosit inhibisyonu .....	23
2.4.6. Antikomplement tedavi .....	24
2.4.7. Serbest radikal koruyucular .....	24
2.5 DİOSMİN+HESPERİDİNİN .....	26

2.5.1. Diosmin+hesperidinin farmakolojisi: .....	26
2.5.2.Diosmin+hesperidinin sentezi .....	27
2.5.3. Saflaştırma işlemi .....	27
2.5.4. Mikronizasyon işlemi ve önemi: .....	27
2.5.5.Farmakodinamik özellikler.....	27
2.5.6. Farmakokinetik özellikler:.....	29
<b>3.GEREÇLER VE YÖNTEM.....</b>	<b>30</b>
3.1.FLEP MODELİ .....	30
3.2.DİOSMİN +HESPERİDİNİN UYGULANMA ŞEKLİ .....	31
3.3. DENEY PLANI.....	33
3.3.1. Sham grubu;.....	34
3.3.2. Kontrol grubu.....	34
3.3.3. Tedavi-1 grubu.....	35
3.3.4. Tedavi-2 grubu.....	35
3.4. FLEP CANLILIK ORANLARININ BELİRLENMESİ .....	35
3.5. HİSTOLOJİK ANALİZ .....	36
3.6. BİYOKİMYASAL ANALİZ: .....	36
3.6.1. Malondialdehit (MDA) Tayini: .....	36
3.6.2. Myeloperoksidaz (MPO) tayini .....	37
3.7. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM .....	37
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>38</b>
4.1.FLEP CANLILIK ORANLARI .....	38
4.2.NÖTROFİL SAYIMI .....	40
4.3.DAMAR ÇAPLARI ÖLÇÜMÜ.....	41
4.4. MALONDİALDEHİT DÜZEYİ.....	42
4.5. MYELOPEROKSİDAZ DÜZEYİ:.....	44
4.6. FLEP CANLILIĞI, MDA, MPO VE DAMAR ÇAPLARI ARASINDAKİ İLİŞKİLER.....	48

<b>5. TARTIŞMA .....</b>	<b>51</b>
<b>6. SONUÇLAR .....</b>	<b>58</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>59</b>
<b>TEZ ONAY SAYFASI.....</b>	<b>73</b>

## KISALTMALAR

<b>DiEP</b>	: Derin İnferior Epigastrik Arter Perforatör
<b>ICAM-1</b>	: İnterselüler adhezyon molekülü -1
<b>İ-R</b>	: İskemi Reperfüzyon
<b>LTC<sub>4</sub></b>	: Lökotrien C <sub>4</sub>
<b>LTD<sub>4</sub></b>	: Lökotrien D <sub>4</sub>
<b>MDA</b>	: Malondialdehit
<b>MPO</b>	: Myeloperoksidaz
<b>nmol/mL</b>	: nanomol /mikrolitre
<b>NO</b>	: Nitrik Oksit
<b>NOS</b>	: Nitrik Oksit Sentaz
<b>PAF</b>	: Trombosit Aktive Edici Faktör
<b>PECAM-1</b>	: Trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü-1
<b>PGE<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin E <sub>2</sub>
<b>PGF<sub>2@</sub></b>	: Prostaglandin F <sub>2@</sub>
<b>PGI<sub>2</sub></b>	: Prostaglandin I <sub>2</sub>
<b>PMNL</b>	: Polimorf nüveli lökosit
<b>SOD</b>	: Süper Oksit Dismutaz
<b>SOR</b>	: Serbest oksijen radikali
<b>TGF</b>	: Tümör growth faktör
<b>TRAM</b>	: Transvers Rektus Abdominis Kası
<b>T<sub>x</sub>A<sub>2</sub></b>	: Tromboksan A <sub>2</sub>
<b>VCAM-1</b>	: Vasküler hücre adhezyon molekül-1
<b>VEGF</b>	: Vasküler endotelial growth faktör

## TABLolar LİSTESİ

Tablo 1.	İskemi Reperfüzyon Hasarının Özeti .....	13
Tablo 2.	Flep kan akımının kontrolü .....	14
Tablo 3.	İskemi reperfüzyon hasarına karşı tedavi stratejileri.....	25
Tablo 4.	Flavonoidlerin etki mekanizmaları.....	28
Tablo 5.	Deney planı .....	34
Tablo 6.	Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar .....	36
Tablo 7.	Flep canlılık oranları .....	38
Tablo 8.	Nötrofil Sayıları.....	40
Tablo 9.	Gruplarda Damar Çapları ( $\mu$ ) .....	42
Tablo 10.	MDA düzeyleri.....	43
Tablo 11.	MPO düzeyleri. ....	44
Tablo 12.	İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları Genel Tablosu.....	48
Tablo 13.	Spearman's Korelasyon Analizi.....	49



## ŞEKİLLER LİSTESİ

<b>Şekil 1.</b>	Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu.....	7
<b>Şekil 2.</b>	Lökosit endotel etkileşiminde lökosit adezyon molekülleri ve lökosit göçü ..	9
<b>Şekil 3.</b>	İnferior epigastrik ada flebin şekli <sup>(99)</sup> .....	31
<b>Şekil 4.</b>	Preoperatif Flep Çizimi. ....	31
<b>Şekil 5.</b>	Flep elevasyonu.....	32
<b>Şekil 6.</b>	Flep Pediklülünde İskemi.....	32
<b>Şekil 7.</b>	Orta 1/3'lük kısım doku örneği .....	33
<b>Şekil 8.</b>	Gruplara ait flep yaşam oranı örnekleri.....	39
<b>Şekil 9.</b>	Sham grubunda damar çapları ve nötrofil infiltrasyonu.....	46
<b>Şekil 10.</b>	Kontrol grubunda nötrofil infiltrasyonu ve damar çapları .....	46
<b>Şekil 11.</b>	Tedavi-1 grubunda nötrofil infiltrasyonu ve damar çapları gösterilmiştir...47	
<b>Şekil 12.</b>	Tedavi-2 grubunda nötrofil infiltrasyonu ve damar çapları gösterilmiştir...47	

## GRAFİK LİSTESİ

<b>Grafik 1.</b> Flep canlılık oranları.....	39
<b>Grafik 2.</b> Nötrofil Sayıları.....	41
<b>Grafik 3.</b> Damar çapları( $\mu$ ).....	42
<b>Grafik 4.</b> MDA düzeyleri.....	43
<b>Grafik 5.</b> MPO düzeyleri.....	45
<b>Grafik 6.</b> Tüm Gruplardaki Parametrelerin Birbirleriyle Olan İlişkileri.....	50

## RAT ABDOMİNAL EPİGASTRİK FLEBİNDE DİOSMİN + HESPERİDİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ

### ÖZET

**Giriş ve Amaç:** İskemi reperfüzyon(İ-R) hasarı rekonstrüktif cerrahide flep kayıplarının en önemli sebeplerinden biridir. İ-R hasarına bağlı flep kayıplarını azaltmak amacıyla birçok farmakolojik ajan kullanılmış fakat henüz net bir tedavi protokolü bulunmamaktadır. Günümüze kadar yapılan çalışmalarda Diosmin+Hesperidin birçok dokuda (beyin, böbrek, kalp, kas gibi dokularda) İ-R hasarına yönelik olumlu etkileri ortaya konmuştur. Literatürde Diosmin+Hesperidin flepler üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışma bulunmamaktadır. Çeşitli dokularda iskemi reperfüzyon hasarında olumlu etkileri ortaya konmuş Diosmin + Hesperidin bileşiklerinin rat abdominal epigastrik fleplerdeki iskemi reperfüzyon hasarı ve flep yaşamı üzerine de olumlu etkiler göstereceği hipotezine dayanarak bu çalışmayı planladık.

**Gereç ve Yöntem:** Çalışmada Tosa ve arkadaşlarının kullandığı flep model alınarak ratın sağ abdominal bölgesinde 3x6 cm'lik, pedikülünde inferior epigastrik damarları içeren deri flebi kaldırıldı. Sham,kontrol tedavi-1 ve tedavi-2 olmak üzere 4 grupta toplam 40 adet Wistar albino cinsi rat kullanıldı. Pre-operatif on gün post op yedi gün süreyle tedavi-1 grubuna 30mg/kg diosmin+hesperidin, tedavi -2 grubuna 80 mg/kg diosmin+hesperidin verildi. Sham grubu hariç tutularak diğer üç gruba 9 saat iskemi ve 12 saat reperfüzyon yapıldı. Post op 21. saatte biyokimyasal ve patolojik çalışmalar için biyopsiler alındı. Post-operatif yedinci günde makroskopik olarak flep canlılığı araştırıldı.

**Bulgular:** Tüm gruplarda flep canlılık oranları ve nötrofil sayıları anlamlı derecede yüksek bulunmuştur(p<0,05). Biyokimyasal parametreler, MDA(p=0,067) ve MPO(p=0,077) değerlerinde gruplar arası anlamlı fark bulunmasa da anlamlı değere çok yakın değerler elde edilmiştir(p<0,05).Damar çapları arasında ise anlamlı fark bulunamamıştır.

**Sonuç:** İ-R hasarının önlenmesinde, Diosmin+Hesperidin inflamasyonun erken fazında endotel hücrelerinde nötrofil birikimini azalttığı yönünde kuvvetli bulgular elde

ettik.İnflamasyonun ilk basamaklarda inhibe edilmesinin doku hasarının azalmasına bağlı olarak flep canlılığını arttırdığını gösteren ileri verilere ihtiyaç duyulmaktadır.

**Anahtar Kelimeler:** Diosmin+ hesperidin, iskemi reperfüzyon hasarı, rat abdominal epigastrik flep

## THE EFFECT OF DIOSMIN+HESPERININ ON ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN RAT ABDOMINAL EPIGASTRIC FLAP

### ABSTRACT

**Introduction:** Ischemia-reperfusion (I-R) injury is one of the most important cause of loss of the flap reconstructive surgery. Many pharmacological agents in order to reduce loss of flap used depends on the ischemia-reperfusion injury, but there is no clear treatment protocol. Diosmin + Hesperidin in studies carried out to date in many tissues (brain, kidney, heart, muscle and etc.) positive effects for the ischemia-reperfusion injury was revealed. In the literature, there are no studies on the effects on flaps of diosmin + hesperidin. We plan that work in a variety of tissues in ischemia reperfusion injury in have demonstrated the positive effects of Diosmin + Hesperidin compounds of rat ischemia in abdominal and epigastric flap on reperfusion injury and flap survival is based on the hypothesis that show positive effects.

**Materials and Methods:** In this study, flap model was used that described by Tosa at all. The inferior epigastric pedicle flap of skin from the abdominal region of 3x6 cm in size containing vessels were removed. A total of 40 Wistar albino rats, was used in 4 groups, including the sham control, treatment,1 and treatment-2. Preoperative ten days postoperative seven days, the treatment-1 group 30mg / kg Diosmin+Hesperidin, the treatment group-2 80mg / kg Diosmin+Hesperidin were given.Except sham group, for the other three groups nine hours of ischemia and twelve hours of reperfusion was performed. 21 hours post-operative biopsy for biochemical and pathological studies were included. Macroscopically the seventh day post-operative flap viability was investigated.

**Results:** In all groups flap viability and neutrophil counts were significantly higher ( $p < 0.05$ ). Biochemical parameters, MDA ( $p = 0.067$ ) and MPO ( $p = 0.077$ ) were not significantly different between groups, but the results obtained were very close to the significant  $p$  value ( $p < 0.05$ ). There was no significant difference between the diameter of the vessel.

**Conclusion:** We obtained stronge evidence about the prevention of ischemia-reperfusion injury, the direction of diosmin + hesperidin reduced neutrophil

accumulation in the early phase of inflammation in endothelial cells, we obtained strong evidence. Inhibition of the first steps of inflammation showing that reduced tissue damage due to increase flap viability is need further data.

**Key Words:** Diosmin + Hesperidin, ischemia-reperfusion injury, rat abdominal epigastric flap.

## 1. GİRİŞ VE AMAÇ

Doğumsal veya edinsel defektlerin uygun şekil ve fonksiyonda onarımı, onarım merdiveni üzerinden basit yöntemden karmaşık olana doğru yapılır. Bu sıra primer onarım, defektin ikincil iyileşmeye bırakılması, deri greftleri, lokal, uzak ve serbest fleplerle onarım şeklindedir. Koşullara göre en basit seçenek kimi zaman ilk tercih olsa da artan bilgi, gelişen mikro cerrahi ve teknoloji nedeniyle uygun olgularda daha üst basamaklar ilk tedavi seçeneği olabilmektedir<sup>(1)</sup>. Son yıllarda onarım için daha fonksiyonel ve estetik sonuçlar ile daha az verici alan hasarı beklentisine yönelik perforatör ve "serbest stilde serbest" flepler geliştirilmiştir<sup>(2)</sup>.

Günümüzde vücuttaki hemen her vaskularize yapının aktarılabilmesi mümkündür. Taylor; flep kanlanması devamlı 3 boyutlu damarsal yapının sadece deride değil tüm doku tabakalarında gerçekleştiğini göstermiştir. Segmental damarların deri ile kemik arasında beslediği üç boyutlu alana veya dolaşımını tanımlanmış arter ve eşlik eden ven ile sağlanan doku bloğuna anjiozom denilmektedir. Anatomik çalışmalarda insanda ortalama 374 major perforatör gösterilmiştir. Taylor, vücudu anatomik olarak çeşitli kaynak arterlerden beslenen 40 kompozit doku (anjiozom) alanına ayırmıştır. Böylece birçok flep tanımlanmayı beklemektedir. Bu nedenlerle anjiozomlar kompozit nakli mümkün olan dokular olarak tanımlanır<sup>(3)</sup>.

Artan anatomik çalışmalar ile flep tasarımlarının ve anjiozomların tanımlanmasına rağmen, halen flep nekrozu rekonstrüktif cerrahi için sorun teşkil etmektedir. Günümüzde, gittikçe yaygınlaşan serbest doku uygulamalarında, başarı oranı %90

üzerine kadar ulaşırsa da, pediküllü fleplerde kısmi veya tam flep kayıplarının ve komplikasyonlarının, farklı serilerde %25'e kadar ulaştığı bildirilmiştir<sup>(2)</sup>.

Rekonstrüktif cerrahide flep sağkalımı; hasta seçimi, cerrahi teknik, iskemi süresi ve derinliği ile doğrudan ilişkilidir. İskemi özellikle mikrovasküler cerrahide ileri derecede önem kazanmaktadır. Serbest doku aktarımları sonrasında iskemiden kaynaklanan yıkımın patofizyolojisinde reperfüzyon hasarı ve oluşan serbest radikallerin önemli bir pay sahibi olduklarına olan inanç giderek artmaktadır. Bu konu üzerinde plastik cerrahi alanında son 20 yılda pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, reperfüzyon hasarının patofizyolojisi halen tümüyle anlaşılabilmiş değildir<sup>(4)</sup>.

Flep sağkalımı flep içi damar yapılanmasına bağlıdır. Flep içi damarsal yapılanma ve vaskular fizyoloji flep cerrahisinde başarı ve kaybını belirler. Tüm dokularda olduğu gibi fleplerde de makro ve mikro dolaşım vardır. Makro dolaşım anatomisi flep tanımı ve dizaynında kullanılır. Mikro dolaşım seviyesindeki arteriol, kapiller, venül ve arterio-venöz anastomozlar; besin, oksijen, karbondioksit (CO<sub>2</sub>) ve atık ürünlerin yani hücrel metabolizmanın gerçekleştiği ve çoğunlukla perfüzyonun kontrol edildiği yerlerdir<sup>(5)</sup>.

Bazı fleplerin tamamı yaşarken, bazılarının distal veya periferik kısımlarında kayıp olmasında pek çok faktör etkili olmakla birlikte mekanizma tam anlamıyla açıklanamamaktadır. Deri flepleri her ne kadar daha az kan akımına sahip olsalar da, metabolik ihtiyaçları kaslardan daha azdır ve iskemi periyotlarına karşı daha toleranslıdırlar<sup>(6)</sup>.

Mikro dolaşımdaki etkin perfüzyon, besleyen damara yakınlığa bağlıdır. Aksiyel akımlı flepler, diğer fleplere oranla daha güvenlidirler. Baskın besleyici damar sistemine bağlı olmayan random fleplerde akım, subdermal ve subfasyal pleksuslar yoluyla gerçekleşir. Sonuçta daha az güvenlidirler ve uzunlukları daha sınırlıdır<sup>(7)</sup>.

Birçok farmakolojik ajanın flep sağkalımı ve perfüzyonun düzelmesine yönelik farklı etkinlik gösterdiği bildirilmektedir. Çoğu deneysel olarak etkili bulunsa da, öngörülebilir klinik etkileri hala gösterilememiştir<sup>(8)</sup>.

Diosmin+Hesperidin günümüze kadar yapılan çalışmalarda birçok dokuda (beyin, böbrek, kalp, kas gibi dokularda) iskemi reperfüzyon(I/R) hasarına yönelik olumlu



etkileri ortaya konmuştur. Literatürde Diosmin+ Hesperidinin flepte oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkisini araştıran herhangi bir çalışmaya rastlanılmamıştır.

Çeşitli dokularda iskemi reperfüzyon hasarında olumlu etkileri ortaya konmuş Diosmin + Hesperidin bileşiklerinin rat abdominal epigastrik fleplerdeki iskemi reperfüzyon hasarı ve flep yaşamı üzerine de olumlu etkiler göstereceği hipotezine dayanarak bu çalışmayı planladık.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI:

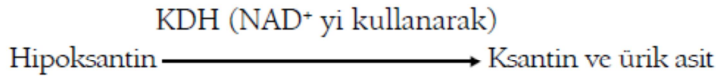
Arteriyel ya da venöz kan akımı azalmasına bağlı organ ve dokunun yetersiz perfüzyonu sonucu bu doku veya organların oksijenden yoksun kalması şeklinde tanımlanan iskemi, hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi sonucunda hücre ölümüne yol açmaktadır. İskemik dokuya hem hücrenin rejenerasyonu, hem de toksik metabolitlerin temizlenmesi için yeniden kan akımı gerekir. Ancak, iskemik dokunun reperfüzyonu dokuda paradoksal olarak sadece iskemi ile oluşan hasara göre çok daha ciddi bir hasara yol açar<sup>(9)</sup>. Reperfüzyon döneminde gözlenen hasarda, hücre içine moleküler oksijen girişi ile hızla oluşan serbest oksijen radikal (SOR) türevleri başta olmak üzere birçok mekanizma rol oynamaktadır. Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücrel yapılar, zar lipitleri, proteinler, nükleik asitler ve deoksiribonükleik asit molekülleridir<sup>(10)</sup>.

İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücrel oksidatif fosforilasyon azalır ve adenosin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır<sup>(11)</sup>. Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde  $\text{Na}^+$  ve  $\text{Ca}^{2+}$  iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde  $\text{Ca}^{2+}$  iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir<sup>(12)</sup>. Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar. İskemi döneminde ATP üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için

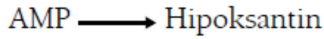
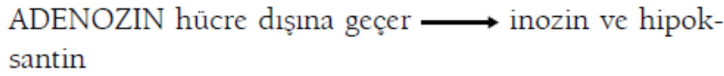
ATP'den AMP ve adenozin oluşur. Adenozin, hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. Dolayısıyla, iskemi sonucu yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin (ATP) yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar<sup>(13)</sup>.

Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olur ve bu reaksiyonda elektron alıcı  $NAD^+$  (nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu) dir. Ancak hipoksi ya da iskemi nedeniyle  $KDH \rightarrow KO$ 'a dönüştüğünden hipoksantin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleşir ve bu reaksiyonda ise elektron alıcı olarak moleküler oksijen kullanılır<sup>(14)</sup>.

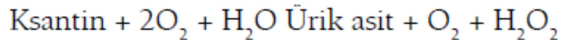
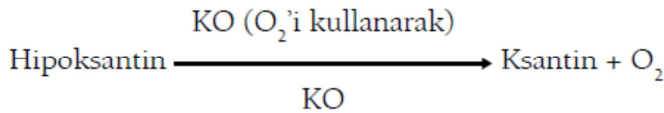
**Normal şartlarda:**



**İskemide:**



**Reperfüzyon ile:**



İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir<sup>(15)</sup>.

Özellikle;

- 1- Serbest oksijen radikalleri
- 2- Polimorf nüveli lökositler (PMNL)
- 3- Kompleman sistemi

4- Endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır.

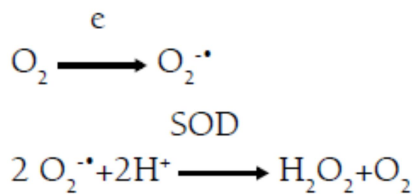
### 2.1.1. Serbest radikaller

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir.

Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Atmosferin %21'ini teşkil eden oksijenin aerobik organizmanın yaşamı için gerekliliği kaçınılmazdır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir.

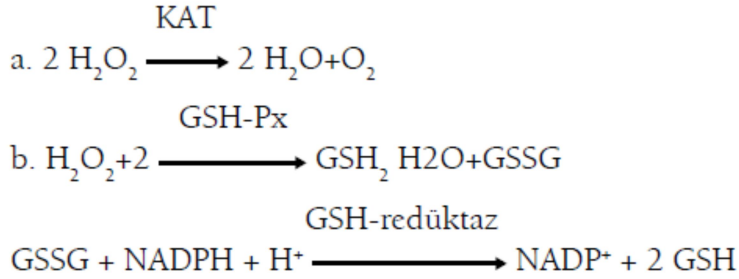
Biyolojik sistemlerde oluşan serbest radikallerin endojen kaynakları oksijen, nitrik oksit (NO), uyarılmış nötrofil, mitokondriyal elektron transport sistemi, endoplazmik retikulum, peroksizom ve plazma membranı olarak sayılabilir. Solunan oksijenin % 95'inden fazlası mitokondrilerde ATP şeklinde enerji oluşumunda kullanılırken, yaklaşık %5'i de son yörüngelerinde ortaklanmamış elektron içeren ve bu özellikleri nedeniyle de toksik serbest radikallere dönüşmektedir (Şekil 1). İnsanda her yıl 2 kg O<sub>2</sub> oluştuğu bildirilmiştir<sup>(16)</sup>.

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir<sup>(17)</sup>.

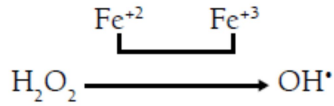


Hidrojen peroksinin hücre içinde metabolizması birkaç şekilde olabilir:

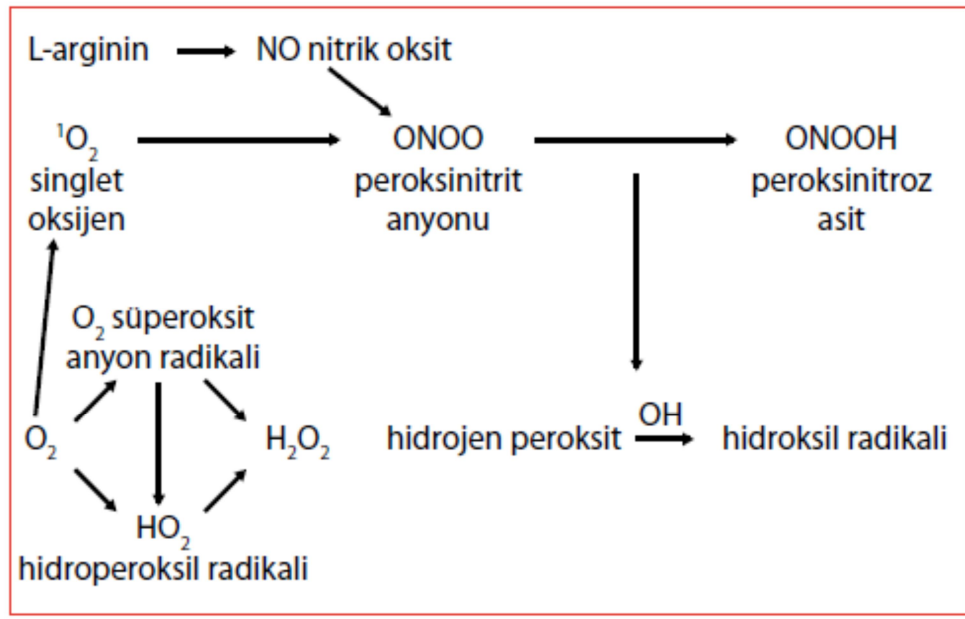
1- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSHPx) tarafından toksik olmayan ürünlere dönüşür:



2- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geçiş metallerinin varlığında toksik OH<sup>-</sup> radikaline dönüşür: Fenton reaksiyonu.



Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir. Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur (Şekil 1).



Şekil 1. Moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu

Makromoleküller hücrelerde kısıtlı miktarlarda bulduklarından bu yapılarda oluşan hasar oldukça önemlidir. İn vivo herhangi bir OH radikal süpürücüsünün etkili olabilmesi için mevcut hedef moleküllerin önemli bir bölümünü kapsayacak kadar yüksek konsantrasyonda bulunması gerekir. Bu nedenle OH radikalının oluşumunun önlenmesi, bu radikalın süpürülmesinden daha etkilidir<sup>(18)</sup>.

### **2.1.2 Polimorf nüveli lökositler (PMNL)**

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilededeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir. İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir<sup>(19)</sup>. Diğer taraftan, PMNL yüksek miktarda süperoksit radikalleri (SOR) üretme kapasitesine de sahiptir.

İskemi reperfüzyon hasarında PMNL'in rolü ile ilgili bazı mekanizmalar ileri sürülmüştür.

Bunlar:

1-Mikrovasküler oklüzyon;

2-SOR salınması;

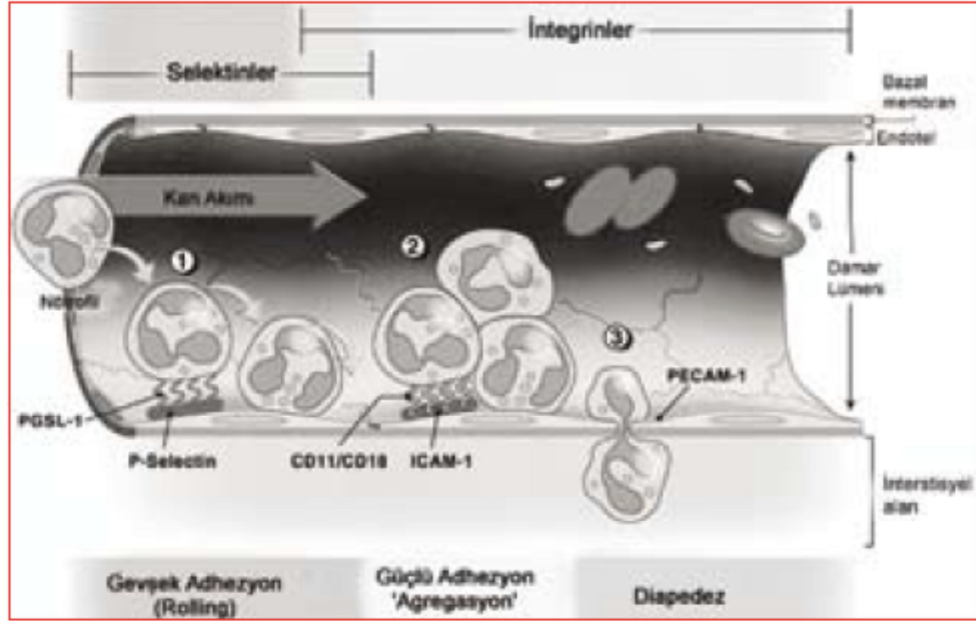
3-itotoksik enzim salınması;

4-Vasküler permeabilite artışı;

5-Sitokin salınmasında artıştır.

PMN'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır. Bu molekül, PMNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein 1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1

(ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir. Üçüncü aşama ise, trombosit-endoel hücre adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ve endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim lökosit transmigasyonu gerçekleştirir. Aktive lökositler damar dışına ulaşınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) <sup>(20)</sup> (Şekil -2).



**Şekil 2.** Lökosit endotel etkileşiminde lökosit adezyon molekülleri ve lökosit göçü

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır.

Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-a) sentezine yol açar. Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden inflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdukları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar.

Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Programlı hücre ölümü olarak bilinen apoptozisin gelişmesi, normalde

immün sistemin ve vücut homeostazının vazgeçilmez bir bileşenidir. Hücrel ölüm yolağındaki düzensizlikler, iskemi-reperfüzyon hasarının yanında, kanser, otoimmün hastalıklar, immün sistem bozuklukları ve nörodejeneratif hastalıklara da yol açabilmektedir<sup>(21)</sup>.

Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir:

1-Fosfolipaz A<sub>2</sub> aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostaglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir.

2-Degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır.

3-SOR üretimi gerçekleşir.

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki inflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu inflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdaki uzaklaştırılırlar<sup>(22)</sup>.

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O<sub>2</sub> oluşurken NO oluşumu ise azalır.

Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF,

TNF- $\alpha$  gibi inflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur<sup>(23)</sup>.

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz



ezimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidad ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir.

Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksida dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında miyeloperoksidad enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik molekülle kolayca reaksiyona girebilir.

Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır<sup>(24)</sup>.

### **2.1.3. Komplemanın rolü**

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF-a, IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır:

1-Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)

2-İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1)

3-E-selektin

4-P-selektin

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar <sup>(25)</sup>.

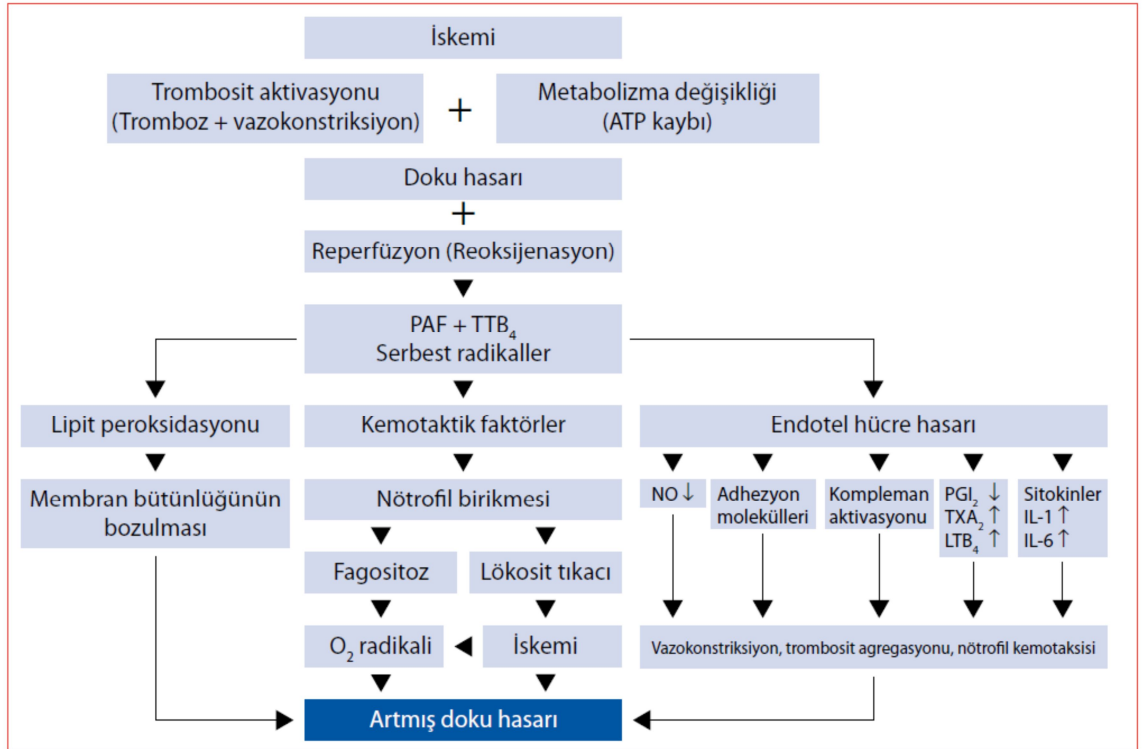
#### **2.1.4. Endotel hücresinin rolü**

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler homeostazdan sorumlu olan endotelini (ET) ve NO'ı üretir. NO arteriyel dolaşımında ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir. Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur <sup>(26)</sup>.

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I<sub>2</sub>, PG E<sub>2</sub>), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A<sub>2</sub> (TxA<sub>2</sub>) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgıllama yeteneğindedir. Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'e antioksidan bir etki kazandırır.

Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO<sub>3</sub>-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'in dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücrel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler <sup>(27)</sup>.

**Tablo 1.** İskemi Reperfüzyon Hasarının Özeti.



## 2.2. FLEP KAN AKIMININ DÜZENLENMESİ

Derinin primer fonksiyonlarından biri; deri kan akımının düzenlenmesiyle oluşan ısı düzenlenmesidir. Deri kan akımı esas olarak, arteriolar seviyede düzenlenir. Sempatik etki, prekapiller sfinkter, arteriolar ve arteriovenöz anastomozlarda kan akımını düzenler. Sempatik etki sonrası prekapiller sfinkterin kasılmasıyla kan doğrudan arteriovenöz anastomoza yönelir<sup>(8)</sup>. Kan akımına etkili diğer faktörler arasında; mikro dolaşımdaki endotel, trombosit ve lökosit gibi hücreler ve sistemik santral kan basıncı sayılabilir. Endotel gerek direkt vazoaktif maddeler olarak, gerekse dolaşımdaki lökosit ve trombositler üzerindeki etkileri nedeniyle kan akımının düzenlenmesinde kritik rol oynamaktadır<sup>(28)</sup>. Deriye olan kan akımı yaklaşık olarak 100 gr doku için 20 ml. dir. Bu miktar artan metabolik aktivite nedeniyle kaslarda çok daha yüksektir. Flep sağ kalımı, kan akımı ile metabolik ihtiyaç arasındaki kritik dengeye dayanmaktadır. Deri kan akımı, lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede kontrol edilmektedir. Sistemik kontrol, nöral ve hormonal olabilmektedir. Nöral dengeleme daha baskındır ve başlıca; vazokonstriksiyonu sağlayan sempatik lifler, alfa adrenajik reseptörler ile

vazodilatasyon yapan beta adrenerjik reseptörler aracılığıyla gerçekleşir. Arteriol ve arteriovenoz anastomoz seviyesinde damar düz kas tonusunu düzenlerler.

Hormonal dengeleme, sistemik vazoaktif maddelerin kendilerine özgün reseptörlerdeki aktiviteleriyle sağlanmaktadır. Sistemik vazokonstriktörler, serotonin, tromboksan A<sub>2</sub> ve prostaglandin F<sub>2α</sub> yı içerir. Vazodilatatörler ise prostaglandin E<sub>1</sub>, prostaglandin I<sub>2</sub>(prostasiklin), histamin, bradikinin ve lökotrien C<sub>4</sub> ve D<sub>4</sub> ten oluşur<sup>(8)</sup>.

Lokal düzeyde vazodilatasyona yol açan hiperkapni, hipoksi ve asidoz gibi metabolik faktörler, deri kan akımını etkilemektedir. Artmış doku perfüzyonu ve hipotermi ise lokal olarak vazokonstriksiyon ile kan akımını azaltmaktadırlar<sup>(29)</sup>.

**Tablo 2.** Flep kan akımının kontrolü<sup>(30)</sup>

	Kategori	Ajan	Mediator	Etki
<b>Sistemik kontrol</b>	<b>Nöral</b>	Sempatik lifler	α-adrenerjik reseptörler	Vazokonstriksiyon
	<b>Nöral</b>	Sempatik lifler	β-adrenerjik reseptörler	Vazodilatasyon
	<b>Nöral</b>	Sempatik lifler	seratonerjik reseptörler	Vazokonstriksiyon
	<b>Hümorale</b>	Norepinefrin, epinefrin	α –adrenerjik reseptörler	Vazokonstriksiyon
	<b>Hümorale</b>	Serotonin, TxA <sub>2</sub> , PGF <sub>2α</sub>	Değişken	Vazokonstriksiyon
	<b>Hümorale</b>	PGE <sub>1</sub> , PGI <sub>2</sub> , Histamin, bradikinin, LTC <sub>4</sub> ve LTD <sub>4</sub>	Değişken	Vazodilatasyon
	<b>Reolojik</b>	Anemi	Hemodilüsyon	Artmış kan akımı
	<b>Reolojik</b>	Polisitemi, orak hücre	Katılaşma	Azalmış kan akımı
<b>Lokal kontrol</b>		Hiperkapni, hipoksi, asidoz, hipertermi Myojenik refleks, hipotermi	Değişken Artmış doku perfüzyonu	Vazodilatasyon Vazokonstriksiyon Vazokonstriksiyon

TxA<sub>2</sub>: Tromboksan A<sub>2</sub>, PGF<sub>2α</sub>: Prostaglandin F<sub>2α</sub>, PGE<sub>1</sub>: Prostaglandin E<sub>1</sub>, PGI<sub>2</sub>: Prostaglandin I<sub>2</sub>, LTC<sub>4</sub>: Lökotrien C<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub>: Lökotrien D<sub>4</sub>

Flep kaldırılırken, kutanöz damarlar ve sempatik sinirlerin uçları hasarlanmaktadır. Akut olarak kaldırılan flepte akım oranı düşmektedir. Distale doğru akım düşerken iskemi artmaktadır<sup>(8)</sup>. Ayrıca, cerrahi geciktirme ile sağlanan akımın genişleyen arteriovenöz şantların kendiliğinden kapanmasına kadar süreceği bildirilmiştir. Flep

kaldırılmasındaki bu hemodinamik, anatomik ve metabolik değişiklikler, sonucu belirler.

Yapılan pek çok hemodinami çalışmalarında, flebin pedikülündeki akım korunsa bile, flebin ucundaki akım, ilk 6-12 saatte normalin %20'sinin altına düşer. İlk 12-18 saat süresince; ilerleyen lökosit aracılı endotel hasarı, sempatik vazokonstriktörlerin salınımı ve düşen perfüzyon basıncının kombinasyonu nedeniyle, özellikle flep distal kısımlarında akım dramatik olarak düşer. Uç kısmın yaşayabilmesi için yeterli akım, 6-12 saat devam etmelidir. Nörotransmitterlerin 12-24 saatte ortaya çıkması ve flep yatağından 2-3 gün inoskülasyonun gerçekleşmesiyle perfüzyon dereceli olarak düzelir. Uç kısımlar 6-12 saat süreyle ciddi seviyede iskemide kalırsa, akım geri dönmesi reperfüzyon hasarına yol açar, mikro damarlar iflas eder ve doku nekroze olur<sup>(31)</sup>.

### **2.3. FLEP KAYBI VE İSKEMİ –REPERFÜZYON HASARI:**

Flep kaldırıldıktan sonra distal kısımdaki lokal iskemi azami vazodilatasyona yol açar. Proksimal kısımdaki yetersiz perfüzyon basıncı flebin distalinde arteryel yetersizlik ve kayba neden olur<sup>(31,32)</sup>. Arteryel ve venöz yetmezliğin pediküllü fleplerdeki kayıplara etkileri üzerine pek çok çalışmalar yapılmıştır. Venöz akımdaki yetmezliğin, yeterli arteryel akım olsa bile flep nekrozuna neden olabileceği gösterilmiştir. Serbest doku aktarımlarında venöz oklüzyon, arteryel oklüzyondan daha sıktır ve hızla düzeltilmezse flep kaybı ile sonuçlanır. Çoğu pediküllü fleplerde ise ikisi birlikte olur ve nekroze olan doku miktarı belirgin olarak daha fazladır. Deneysel modellerde primer venöz iskemi arteryele oranla daha ciddi gözükmektedir. Benzer olarak sekonder iskemi modellerinde de venöz iskemi arteryel iskemiden ve primer iskemiden daha tehlikelidir<sup>(33)</sup>. Random ve aksiyel kalıplı fleplerde hatalı flep planlaması, iskemi reperfüzyon hasarı, mikro dolaşımı etkileyen sistemik faktörler (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstriktörler) veya flep üzerine fiziksel baskı (hatalı yerleştirme, pedikülde katlanma, hematoma) nedeniyle mikro dolaşım düzeyinde düşük akımın gelişmesine ikincil olarak tromboz oluşur. Serbest flepler içinse total flep nekrozu aksiyel arteryel veya venöz tromboz, anastomoz hattından kaynaklanmaktadır. Bu durum genellikle düzgün endotel uzanımı yerine adventisya ve medianın lümen içinde trombosit ve fibrin depolanmasına yol açan kötü teknik sonucudur. Bu yüzden antitrombotik tedavi serbest fleplerde sıklıkla kullanılmaktadır(8). Hücre hasarını oluşturan biyokimyasal süreçlerin

başlamasında bugün kabul gören tetikleyici başlangıç noktası, hücrenin enerji depolarının belirli bir seviyenin altına inmesidir. Bu basamak, daha sonra oluşacak, yıkım potansiyeli çok daha fazla olan ve moleküler oksijenin geri gelmesi ile tetiklenen reaksiyonlara zemin hazırlamaktadır. Sonuçta; hücre içerisinde çok yüksek oranlarda süperoksit ile bundan oluşan sekonder reaktif moleküller üretilen ve masif doku yıkımı oluşacaktır. Kritik iskemi süresi (KİS); kan akımının kesilmesinden sonra, dokunun canlı kalması ve enerji depolarının eşik seviyenin altına azalmasına kadar geçen azami süreyi ifade eder. Bu süre aşıldığında doku perfüzyonu yeniden sağlansa dahi doku hasarı kaçınılmazdır<sup>(34)</sup>.

İskemik doku anaerob metabolizmaya yönelir ve oksijen, glikoz, adenozin trifosfat (ATP) seviyeleri düşerken; CO<sub>2</sub>, laktik asit seviyeleri artmaktadır. Prostaglandin ve tromboksan düzeyleri belirgin olarak yükselir<sup>(35)</sup>.

Hipoksi, dokuda neden olduğu iyon dengesizliği, ATP/ADP oranının azalması ve mitokondriyal permeabilite bozulması gibi olumsuz değişikliklerle reaktif moleküllere karşı hücre savunmasını zayıflatmaktadır. Bu durum, hipoksinin sadece reaktif oksijen üretimini arttırmak yoluyla dahi hücre hasarına yol açtığını göstermektedir.<sup>(36)</sup>

Anaerobik metabolizmayla birlikte toksik süperoksit radikallerin üretiminde artış olur. Bu radikaller direkt sitotoksik etki gösterebilir veya daha da önemli olarak, lokal akut inflamasyonun, sonrasında endotelial hasarın ve hücreler arası olaylarla mikro dolaşımın iflasının gelişeceği lökosit yapışmasının ve birikiminin tetikleyicisi olarak rol alırlar. Flep distalinde vücudun anahtar koruyucu enzimi olan süperoksit dismutaz düzeylerinde düşme olur<sup>(37)</sup>

İskemi sonrası yeniden oksijenlenme sırasında ksantin dehidrojenaz enzimi ksantin oksidaza dönüşür. Ksantin oksidaz; oksijen ve iskemide oluşan hipoksantin ile reaksiyona girer ve ürün olarak süperoksit anyon oluşur. Bu anyon diğer oksijen radikal türlerine dönüşerek doğrudan hücre hasarı yapar. Süperoksit radikal, endotel ile doğrudan etkileşir ve lipid peroksidasyonu, membran proteinlerinde ayrışma, hücre geçirgenliğinde artış, sitoplazmik şişme ve işlev bozukluğuna yol açar. İkinci mekanizma oksijen metabolitleri tarafından reperfüzyon sahasına nötrofil göçü sonrası gerçekleşir. Damar içinde hızla nötrofil birikimi perfüzyonun ilerleyen şekilde azalmasına ve iskemi–reperfüzyonla ilişkili “noreflowfenomenine” yol açmaktadır.

Nötrofiller doğrudan endotel hasarına sebep oldukları veya mikro damarlarda tıkanma yaparak iskemi oluşturdukları bildirilmiştir <sup>(38)</sup>.

Lantieri ve ark. TRAM (Transvers Rektus Abdominis Muskulokütan) ya da DIEP (Derin İnferior Epigastrik Arter Perforatör) flepleri ile meme rekonstrüksiyonu uygulanan hastalarda reperfüzyon öncesi ve sonrasında genel dolaşımdan ve flepten aldıkları kan ve doku örneklerinde çok güçlü bir vazospazm yapıcı ajan olan endotelin-1 düzeylerini araştırmışlardır. Çalışmayla serbest fleplerde anlamlı bir endotelin-1 artışı izlenmiştir. Sonuç no-reflow fenomeninin patogenezi anlamamıza yeni bir katkı sağlamıştır. Oksijen metabolitleri ve onların doku hasarına etkileri üzerine birçok çalışma yapılmıştır <sup>(36,37)</sup>. Fleplerin distallerinde ksantin oksidaz ve diğer bir serbest radikal oluşumunu gösteren malonildialdehit düzeylerinde artış gözlenen çalışmalar mevcuttur <sup>(39)</sup>. Süperoksitdismutaz uygulaması ile flep sağ kalımının arttığı gözlenmiştir <sup>(37)</sup>. Bu bulgulara dayanarak allopurinol (ksantin oksidaz inhibitörü) ve deferoksamin (demir şelatörü ve serbest radikal temizleyicisi) kullanılmıştır. Buna rağmen insan dokusundaki ksantin oksidazın sıçandakinin 1/40'ı kadar olması nedeniyle bu çalışmaların klinik etkinlikleri belirsizdir <sup>(40,41,42)</sup>. Serbest radikaller hematoma ilişkili flep nekrozunda da önemli rol oynarlar. Hemoglobin ve demir, hidroksil radikali başta olmak üzere birçok serbest radikal oluşacağı kimyasal reaksiyonlara katılırlar. Desferoksaminin deneysel olarak hematoma varlığında flep sağ kalımını artırdığı gösterilmiştir <sup>(41)</sup>.

İskemi-reperfüzyon hasarı günümüzde klinik olarak kalp ve beyin başta olmak üzere tüm organların iskemik durumlarını takip eden, örneğin stent uygulaması, anjioplasti ya da fibrinolitik tedavi sonrası reoksijenasyonunda, viseral dokuların allotransplantasyonunda, hemorajik şokta, plastik cerrahide replantasyon ve mikrovasküler flep cerrahisinde karşımıza çıkmaktadır <sup>(5)</sup>.

#### **2.4. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI TEDAVİ YAKLAŞIMLARI**

Reperfüzyon hasarında klinik insan çalışmaları yetersizdir ve terapötik müdahaleler sınırlı başarıya sahiptir. Geleneksel cerrahi mantığa uygun olarak iskemik zamanı azaltmak dokudaki olayları minimale indirmek açısından önemlidir. Ancak bazı durumlarda iskemi süresi cerrahin kontrolü dışına çıkar ve diğer önlemlerle reperfüzyon hasarının boyutunu azaltmayı gerektirir <sup>(43)</sup>. İskemik kalan dokuda dört saate kadar geri

dönüşümlü hasar meydana gelirken, altıncı ve onikinci saatlerde geri dönüşümsüz hasar meydana gelir <sup>(44)</sup>. Kritik iskemi süresi fleplerin tolere edebildikleri en uzun iskemi süresidir ve dolaşımın tekrar restore edilmesiyle flepler canlı kalırlar. Ortalama kritik iskemi süresi fleplerde % 50 ölüme neden olan iskemi süresidir.

#### **2.4.1. Hipotermi ve intraarteriyel yıkama**

Mowlavi ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada ampute dokuların hipotermik olarak saklanmaları klinik olarak iyi bilinen ve kritik iskemi süresini uzatan ve replantasyon başarısını artıran bir metottur. Hipotermi, reperfüzyon sonrası dokuların içine lökosit akımını azaltır, bu da ROS'un azalmış yapımıyla ilişkilidir. Rat grasilis kas flebinde reperfüzyonda hipotermi uygulanmasıyla koruyucu etki elde edilmiştir. İskemi süresince hipotermi ATP tükemini azaltıp hipoksantin birikimini azaltır. Reperfüzyonda uygulanan hipotermide hipoksantin yıkılıp ROS un açığa çıkacağı basamağı sınırlar <sup>(45)</sup>. Hayvan deneylerindeki kanıtlara göre soğuk solüsyonlarla intraarteriyel yıkama ampute uzuvlarda daha dengeli ısı azalması sağlamıştır <sup>(46)</sup>.

İntraarteriyel infüzyon ya da yıkama reperfüzyon hasarını azaltmak için diğer bir tedavi seçeneğidir. Çeşitli farmakolojik ajanlar ve solüsyonlar, tek ya da kombine şekilde kullanılmışlardır. Wisconsin Üniversitesi solüsyonu insanlardaki serbest flepler için optimal endotelial koruma sağlamıştır. Wisconsin üniversitesi solüsyonu, reperfüzyon hasarına karşı, lipid peroksidasyon inhibitörü, radikal koruyucu antiinflamatuvar modülatörler ve nitrik oksit donörü muhtevası ile ileri düzeyde modifiye edilmiştir <sup>(43)</sup>. Özellikle kas fleplerinde doku koruyucu solüsyonlarla intraarteriyel yıkama ve hipotermi flep canlılığını önemli derecede artırabilir <sup>(47)</sup>. İntraarteriyel yıkama iskemi süresi uzamış kötü fleplerde önemli ölçüde yarar sağlar. Fizyolojik solüsyonlar serbest radikal koruyucu ilavelerle modifiye edilmiştir. Bunlar serbest radikal koruyucu (süperoksit dismutaz), radikal koruyucu ve trombolitik ajan kombinasyonu (ürokinaz, süperoksit dismutaz, streptokinaz), antitrombotik ajan (heparin ve prostoglandin E<sub>1</sub>) ile birlikte insan ve hayvanlarda başarıyla kullanılmışlardır <sup>(48-51)</sup>.

#### **2.4.2. İskemik Önkoşullama ve Geciktirme (Delay) Fenomeni**

Cerrahi geciktirme işlemi flep sağkalımını klinik olarak artırdığı defalarca gösterilen tek gerçekçi yöntemdir. Bu yöntemde flep kısmi olarak kaldırılmakta, flep distalinde



nekroza yol açmayacak kadar iskemi oluşturulmaktadır. Böylelikle flebin tamamı akut olarak kaldırıldığında oluşması beklenen distal nekrozun, bu yöntem sonrasında flebin tamamı kaldırıldığında oluşmadığı gösterilmiştir <sup>(52,53)</sup>.

Delay fenomeni'nde yeni damar oluşumu (neovaskularizasyon) da rol oynayabilir. Bu olayda fiziksel değişimin veya hücresele seviyedeki fizyolojik değişimlerin daha belirgin olduğu net değildir. Yine de fiziksel değişim için gün veya haftalar gerekirken, hücresele değişimler çok daha hızlı olacaktır. Dhar ve Taylor primer olayın yeni damar oluşumu değil, flep damarlarındaki genişleme olduğunu bildirmiştir. Operasyondan 3 saat sonra çözülen ve en fazla 48 – 72 saat arasında anastomotik damarlardaki aktif ve ilerleyici genişleme ile sonuçlanan başlangıçta bir vazokonstriksiyon periyodunu gözlemlediler. Anastomotik (choke) damarlardaki bu genişleme; arter duvarının tüm tabaklarında hiperplazi ve hipertrofi sonucunda kalıcı bir dönüşümdür. Ayrıca Taylor cerrahi geciktirme ile flep uzunluğunda en azından ilave bir vaskuler alanın güvenle eklenebileceğini vurgulamıştır <sup>(52,54)</sup>.

Klasik cerrahi geciktirme işlemi, flep her iki tarafının insize edilmesi ve flep distal ucu salim bırakılarak tabandan ayrılmasını içermektedir. Myers ve Cherry geciktirme işleminin başarılı olabilmesi için cerrahi esnasında flebin aksiyel damarlarının kesilmesi gerektiğini gösterdi. Flebin aksiyel damarlarının kesilmesi ile oluşan kısmi iskeminin, sonradan iskemiye karşı koruyuculuğun uyarılmasındaki kritik rolü vurgulanmıştır. Bu şekilde işlem gerçekleştirildiğinde flep distal kısımdaki yaşayabilirlik artacak ve daha uzun flep hazırlanmasına olanak sağlayacaktır <sup>(54)</sup>. Transvers rektus abdominis kas-deri flebi gibi geniş random kısım içeren aksiyel fleplere cerrahi geciktirme (delay) uygulandığında flep damarlanmasında ve doku canlılığında olumlu etki sağlanabilmektedir. Özellikle serbest doku nakillerinde dokunun iskemiye önkoşullandırılması yoluyla canlılıkta artış olmasının değeri büyüktür. Günümüzde birçok flep araştırmasında odaklanılan alan iskemik önkoşullamadır <sup>(55,56)</sup>.

İskemik önkoşullama dokuya letal olmayan kısa iskemik periyot uygulanması işlemidir. Bu işlem dokunun daha sonra karşılaşacağı uzun iskemiye bağlı hasar için direncini sağlar <sup>(57)</sup>. Başlıca önkoşullama yöntemleri:

1-İskemik( flep geciktirilmesi, klempleme)

2-Uzak iskemik (turnike)

3-Farmakolojik ( adenozin, monofosforil lipit A, NO donörü)

4-Isı uygulaması olarak toplanmıştır <sup>(58-62)</sup>.

İskemik önkoşullamanın dokuyu koruma mekanizması hala tam olarak anlaşılammıştır. Rees ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmalarda random fleplerin distalindeki nötrofil aracılı nekrozun, önkoşullama sonrasında nötrofil birikiminde azalmayla birlikte canlılıkta artış gözlemiştir <sup>(63)</sup>.

Birçok otör, K+-ATP kanalları gibi proteinlerin fosforilasyonuna neden olan protein kinaz C nin aktivasyonu ile hücresel korunmanın sağlandığını öne sürmektedir. Bu görüş, adenozin uygulanmasıyla iskemik önkoşullama benzeri etkinin oluşması ve adenozin reseptör antagonistlerince etkinin önlenmesini gösteren çalışmalarla desteklendi <sup>(64)</sup>. Pang ve arkadaşları, domuz latissimus dorsi kasında en az 3 siklus halinde 10 dakika iskemiye takiben 10 dakika reperfüzyon uygulayarak iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini sağlamıştır. Koruyucu etkinin kas flebinde oluşması için gereken süre daha önce kalp kası için yapılmış olan önkoşullamada gerekenden çok daha fazla idi <sup>(65)</sup>. Reperfüzyon hasarında iskemik toleransın kas lifi tipine göre değiştiği gösterilmiştir <sup>(66)</sup>. İskemi sonrası kas fonksiyonlarının korunmasında iskemik önkoşullamanın olumlu yönde etkisi saptanmıştır <sup>(67)</sup>. Forrest kalpte olduğu gibi domuz kas fleplerinde adenozin ile iskemik toleransta artış gözledi <sup>(68)</sup>. Hopper ve arkadaşları, domuz latissimus kasındaki iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisinin protein kinaz C (PKC) inhibitörlerince bloke edilip, PKC aktivatörlerince taklit edilebileceğini bildirdi<sup>(69)</sup>.

Bir diğer farmakolojik önkoşullama yöntemi de önkoşullamanın geç fazını taklit eden sentetik monofosforil lipit A bileşimidir. Klinikte kardiyak bypass hastalarında kullanılan bu bileşim, deneysel olarak random deri flepleri ve pediküllü iskelet kas fleplerinde uygulanmıştır. Sonuç olarak ilacın nekroz azaltıcı etkisinin hücre içi sinyal aracılarının tetiklenmesine ve nitrik oksit artışına bağlı olduğu belirtilmiştir <sup>(61)</sup>.

Her ne kadar farmakolojik önkoşullama ile başarılı sonuçlar alınsa da, ilaçları yan etkileri (adenozin-hipotansiyon gibi) kullanımlarını sınırlamaktadır. Bu nedenle klinikte

uygulanabilir bir teknik olarak uzak iskemik önkoşullama üzerinde çalışılmıştır. Domuzlarda ekstremiteye turnike ile iskemik önkoşullama uygulanarak latissimus dorsi kas flebindeki nekroz alanında anlamlı azalma gösterilmiştir. Bu koruyucu etkinin mitokondriyal ATP –duyarlı K<sup>+</sup> kanal inhibitörlerince bloke olması, uzak ve lokal iskemik önkoşullamanın benzer mekanizma ile etki ettiğini göstermektedir <sup>(70-72)</sup>.

Önkoşullama için iskemi mevcut tek stres şekli değildir. Isı ve ısı şok proteinlerinin üretimi ile önkoşullama sağlanabilmektedir. Birçok araştırmacı, deneysel olarak ısı şoku uygulayarak flep derisinde ısı şok protein ekspresyonunda artma ile birlikte flep sağkalımında artış sağlanacağını göstermiştir <sup>(73)</sup>.

İskemik önkoşullamadaki tüm mekanizmalar, süregelen çalışmaların konusu olmaya devam etmektedir. Mekanizmaların daha iyi anlaşılması, mekanik önkoşullama tekniklerinde ilerleme ve başka önkoşullama tekniklerinin gelişmesine yol açması beklenmektedir. Bu tekniklerle iskemi ile ilişkili doku hasarı azaltılarak, rekonstrüktif potansiyelimizin genişlemesi sağlanabilir.

### **2.4.3. Antitrombotik ajanlar**

Canlılığı riske girebilecek flepler için heparin kullanılmasının mantığı onun antitrombotik özelliğinden kaynaklanır. Heparin üç önemli antitrombotik özelliğe de sahiptir.

Birincisi; heparin P ve L selektinleri bağlayarak lökositlerin kandan doku içine geçisine engel olur.

İkincisi; heparin proinflamatuvar transkripsiyon faktörü, nükleer faktör kappa aktivasyonunu inhibe ederek inflamatuvar kaskadı bozar.

Üçüncü olarak da heparin lökositlerden ROS üretimini azaltır <sup>(43)</sup>.

Heparin postkapiller venüde lökosit endotel etkileşimini azaltarak, platelet agregasyonunu ve mikrotrombüs formasyonunu azaltarak no-reflow fenomeninin şiddetini azaltma yeteneğindedir. Venöz anastomozun selektif heparinizasyonu yapılan 28 serbest latissimus dorsi kas-deri flebinde, venöz akım ve flep sağ kalımı için önemli fayda sağlanmıştır. Prostaglandin E<sub>1</sub> in heparinle kombine olarak intraarteriyel

infüzyonu 16 yüksek riskli hastanın 15'inde flep sağ kalımı sağlamıştır. Mikrocerrahi yapılan 493 vakada subkutan heparin uygulanmış ve serbest fleplerde postoperatif trombozis sıklığı azaltılmıştır. Heparin aşırı olursa özellikle postoperatif aspirin ve dekstranla birlikte kullanılacaksa operasyonu komplike hale getirebilir.

Düşük doz heparin (100-400U/saat); dekstran 40 (25ml/saat) veya yüksek doz heparin (500-1200U/saat) gibi etkilidir ve intraoperatif kanama olmaksızın kullanılabilir. Yapılan bir çalışmada, rekombinant insan doku faktör yolu inhibitörünün, mikrovasküler anastomoz sırasında intraluminal irrigasyon solusyonları gibi etkili olup olmadığı karşılaştırılmış ve heparin gibi güvenli, tolere edilebilir ve etkili olduğu bulunmuştur <sup>(43)</sup>. Platelet membran reseptör glikoproteini (GP) IIb/IIIa platelete özel integrindir, platelet aktivasyon ve agregasyonuna aracılık eder. Bu reseptörün antagonisti ile (Abciximab) iskemi reperfüzyon hasarından önemli ölçüde koruyucu etki sağlanmıştır <sup>(74)</sup>.

Doku faktörü, damar adventisiasında bulunan bir protein olup önemli bir trombojenik etkendir. Doku faktörü yolu inhibitörü anastomoz alanının trombozunu önlemede önemli bir topikal ajan olarak kullanılmıştır <sup>(75)</sup>.

#### **2.4.4.Nitrik oksit**

Endotel, nitrik oksit (NO) sentezi için önemli bir kaynaktır. Hasar görmüş endotelde NO gibi vazodilatörlerin sentezi azalırken, vazokonstrüktörlerin yıkımı da azalır <sup>(75)</sup>. NO, L-arjininden sentezlenir. Nitrik oksit sentaz (NOS) olarak isimlendirilen bir grup enzim ailesi, nitrik oksiti sentezler. NO doku koruyucu etkili bulunmuştur. Bu etkiler; vasküler tonusun fizyolojik regülasyonu, platelet agregasyonu inhibisyonu, lökosit endotel yapışkanlığının azaltılması, oksijen radikallerinden koruyucu, normal vasküler permeabilitenin sürdürülmesi, düz kas proliferasyonunun inhibisyonu, immün koruyucu, endotel hücre rejenerasyonunun uyarılması olarak sayılabilir. İskemi reperfüzyon, NO salıverilmesini azaltır. Eksojen NO'nun intraarteriyel uygulanması kas-deri ve deri fleplerinin canlılığını artırmıştır <sup>(76)</sup>.

Yapılan bir çalışmada, nitrik oksit donörü nitrosoglutatyon kullanılarak NO düzeyinin artırılmasıyla reperfüzyon hasarında trombosit birikimi ve yapışkanlığı azaltılmıştır.

Nitrosoglutasyon endotelial nitrik oksit sentazı aktive ederek antiinflamatuvar ve vasküler koruyucu etki oluşturur<sup>(77)</sup>.

#### **2.4.5.Lökosit inhibisyonu**

Lökosit kaynaklı hasarı önlemek için, inflamatuvar ajan serbestleşmesi, reseptör blokajı, adezyon molekülü sentezi inhibisyonu veya lökosit-endotel adezyonu blokajı üzerinden çalışmalar yapılmıştır. İnflamatuvar mediatörlerin blokajı lökositaktivasyonunu hafifletmiştir. Bu mediatörler histamin, platelet aktive edici faktör, lökotrien B<sub>4</sub>, tümör nekrozis faktör alfa, interlokin-1 olarak sayılabilir<sup>(78)</sup>.

Lipoksinler araşidonik asitten lipoksijenaz yoluyla türetilen ürünlerdir. Yapılan çalışmalar göstermiştir ki lipoksinler, lökotrienle veya diğer mediatörlerle indüklenmiş lökositlerin kemotaksis, adezyon ve transmigrasyonunu inhibe etmişlerdir. Asetil salisilik asitin de (Aspirin®) lipoksin üretimini stimüle ederek bu etkileri sağladığı görülmüştür. Böylece Aspirin®'in yol açtığı lipoksin analogları ile tedavi, reperfüzyona bağlı lökosit aracılı doku hasarı ve sistemik inflamatuvar cevap sendromuna karşı yeni tedavi yaklaşımı olabilir<sup>(79)</sup>.

Lökosit ilişkili reperfüzyon hasarından korumada başka bir strateji adezyon molekülü sentez inhibisyonudur. Bu amaçla nükleer faktör  $\kappa\text{B}$  gibi transkripsiyon faktörleri antiinflamatuvar ajanlar için hedefdir. Bu antiinflamatuvar ajanlar glukokortikoidler, aspirin, salisilatlar, altın tuzları ve D-penisilamindir<sup>(80)</sup>.

Lökosit aracılı hasardan korumada başka bir strateji lökosit-endotelial adezyonun inhibisyonudur. Bu amaçla lökosit adezyon moleküllerine karşı antikorlar kullanılır. Bu anti-lökosit stratejiler her ne kadar sınırlı klinik uygulamaya sahipse de hayvan çalışmalarında oldukça başarılı bulunmuştur<sup>(80)</sup>. Monoklonal antikor kullanılarak, platelet endotelial hücre adezyon molekülü-1 (PECAM-1)'in bloke edilmesi lökositlerin transendotelial migrasyonunu azaltmış ve kapiller akımı artırmıştır<sup>(76)</sup>.

Lökosit – endotelial adezyon inhibisyonu yoluyla etkiyen bir ajan da nitrik oksittir. Birçok deneysel çalışmada nitrik oksit ve nitrik oksit donörü L-arjinin, iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu bulunmuştur. Nitrik oksitin bu etkisi ICAM-1, E-selektin ve P-selektinlerin inhibisyonu ile meydana gelmektedir<sup>(81)</sup>.

Çetinkale ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, immün suprese ajan FK506 ile tedavi edilmiş ratlarda iskemi reperfüzyon sonrası inguinal ada fleplerinde azalmış nötrofil birikimiyle birlikte artmış sağ kalım, azalmış myeloperoksidaz ve azalmış malondialdehit düzeyleri izlenmiştir<sup>(82)</sup>.

#### **2.4.6. Antikomplement tedavi**

İskemi reperfüzyon hasarı, komplement aktivasyonu ile birçok inflamatuvar mediatörün yapımına yol açan bir olaydır. Komplement aktivasyonu biyolojik aktif potent komplement moleküllerinin salımına yol açar, bunlar anafilotoksin olan C3a ve C5a sitolitik terminal membran atak komplement kompleksi C5b-9 (MAC) dır.

Komplement aktivasyonunu kaskadın değişik düzeylerinde bloke etmek için kullanılan spesifik kompleman inhibitörleri iskemi reperfüzyon hasarından sonra lokal doku hasarını engellemiş ya da azaltmıştır<sup>(83)</sup>. Komplement inhibisyonunda veya komplement eksikliği olan hayvanlarda iskemi reperfüzyon hasarına bağlı doku hasarı azaltılmıştır<sup>(84)</sup>. Antikomplement terapinin rat iskemi reperfüzyon modelinde miyokardial infarkt oranını ve lökosit infiltrasyonunu azalttığı yapılan birçok çalışmada gösterilmiştir<sup>(85)</sup>. Rekombinant soluble komplement reseptör tip-1 (sCRI), iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarında koruyucu bulunmuştur. Diğer bir metodla, C1 esteraz inhibitörü, iskemi reperfüzyonda endotelial adezyon molekül ekspresyonunu azaltmıştır. C5/C5a blokajı iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu bulunmuştur<sup>(76)</sup>.

#### **2.4.7. Serbest radikal koruyucular**

Hayvan modellerinde çeşitli radikal koruyucular kullanılmıştır. Böbrek nakli yapılan hastaların tedavisinde rekombinant insan-inek süperoksit dismutaz kullanılmıştır. Siklosporin tedavisi alan böbrek nakli alıcılarında cerrahi öncesi süperoksit dismutaz alan grupta almayanlara göre akut rejeksiyon daha az izlenmiştir<sup>(86)</sup>. SOD'un fleplerdeki değeri yeni anlaşılmıştır. SOD hayvanlardaki kas-deri ve iskelet kası fleplerinde yaşam oranlarını artırmıştır<sup>(87)</sup>.

A, C ve E vitaminleri antioksidan özellikte mikro besinlerdir. Bu vitaminler radikal koruyucu olarak tek başına etkili değilken diğer vitaminler veya farmakolojik ajanlarla birlikte reperfüzyon hasarını önleyici sinerjistik etki gösterirler. Örneğin A ve E vitaminleri birlikte verildiğinde lipid peroksidasyonunu azaltıp flep sağ kalımını artırır

şeklinde etkili olmuştur<sup>(88)</sup>. E vitamininin iloprostla (prostasiklin stabil formu) kombinasyonu lipid peroksidasyonunu azaltarak iskelet kasında reperfüzyon hasarını azaltmıştır<sup>(89)</sup>.

Allopürinol bir ksantin oksidaz inhibitörüdür, ROS formasyonunu önler. 60 hastanın değerlendirildiği bir klinik çalışmada allopürinol 300mg/gün, 5 gün kullanılmış ve replantasyon yapılan parmaklarda düşük inflamasyon ve duyusunda hızlı düzelmeye sağlamıştır<sup>(43)</sup>.

Antioksidan tedavide üzerinde durulan diğer ajanlar, katalaz, mannitol, Nasetilsistein, demir şelasyonu yapan ajanlar, anjiotensin-konverting enzim inhibitörleri, kalsiyum kanal inhibitörleri olarak sayılabilir<sup>(80)</sup>.

Flep ve ampute organlara uygulanan koruyucu manevralar reperfüzyon hasarı için düşük başarıya sahiptir. Değişken başarı şansı olan bazı çalışmalara rağmen mevcut geçerli bir farmakolojik müdahale yoktur.

Tablo 3. İskemi reperfüzyon hasarına karşı tedavi stratejileri<sup>(80)</sup>

Kontrollü, aşamalı reperfüzyon	
İskemik Önkoşullanma	
Aspirinle ilişkili lipoxin analogları	
Antioksidan tedavi:	
Superoksit dismutaz (SOD)	Vitamin E
N-asetilsistein(NAC)	Katalaz
Allopürinol	Mannitol
Demir şelatörleri	Tiol bileşikleri
Kalsiyum antagonistleri	
Anjiotensin konverting enzim (ACE) inhibitörleri	
Anti-komplement terapi	
Lökosit azlığı/filtrasyon	
Anti-sitokin veya lökosit adezyon molekül antikoru	
Antisense -oligodeoxynucleotides ve transkripsiyon faktör decoys	
Endotelin reseptör antagonistleri	
Platelet aktive edici faktör (PAF) antagonistleri	
Lökotrien-B <sub>4</sub> (LTB <sub>4</sub> ) antagonistleri	

## 2.5 DIOSMİN+HESPERİDİNİN

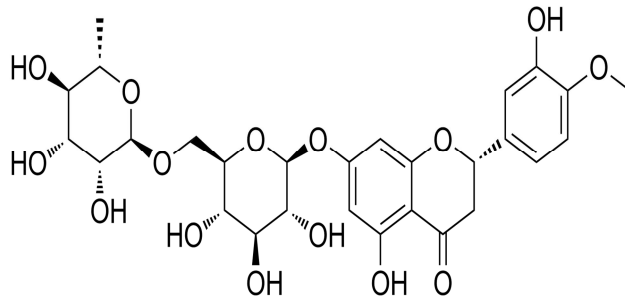
### 2.5.1. Diosmin+hesperidin farmakolojisi:

Flavonoidler çoğu bitkilerde bulunan düşük moleküler ağırlıklı polifenolik bileşiklerdir. Özellikle bitkilerdeki yeşil, turuncu, kırmızı pigmentlerden sorumlu yapılar olarak tanımlanırlar. İn vivo, in vitro ve epidemiyolojik çalışmalarla tespit edilmiş birçok biyoaktiviteleri bildirilmektedir. Kardiyovasküler sistem üzerine olan aktiviteleri en çok üzerinde durulan etkileridir. Bunun yanında serbest radikal uzaklaştırıcı (antioksidan) anti-trombotik, antihipertansif, antiallerjik, antiinflamatuvar, antiapoptotik ve son zamanlarda da antikanserojen aktiviteleri üzerinde çalışmalar devam etmektedir. Ayrıca, flavonoidlerin günümüze kadar yapılan çalışmalarda birçok dokuda (beyin, böbrek, kalp, kas gibi dokularda) çeşitli mekanizmalarla iskemi reperfüzyon(İ/R) hasarına yönelik olumlu etkileri ortaya konmuştur.

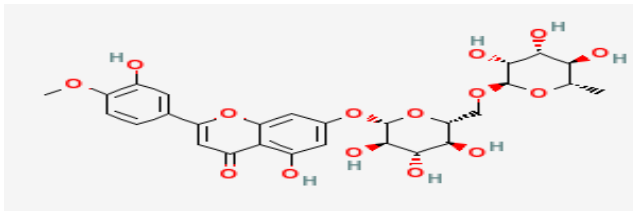
Daflon içerisinde %90 diosmin ve %10 oranında hesperidin bulunduran mikronize saflaştırılmış flavonoid fraksiyonudur. Diosmin doğada birçok bitkinin yapısında bulunan flavonoid glikozittir. Diosmin, yine bir flavonoid olan hesperidinden çeşitli kimyasal yollarla da türetilir. Diosmin hesperidine oranla vücutta daha biyoaktif bir bileşiktir. Diosmin ve hesperidin kombine kullanımı bu bileşiklerin etkilerini potansiyalize etmektedir.

#### Formülü:

**Hesperidin (%10) 50 mg**



**Diosmin (%90) 450 mg**





### **2.5.2.Diosmin+hesperidinin sentezi**

Hesperidin'den diosmin elde edilmesi 4 gün sürmekte ve 4 anabasamaktan meydana gelmektedir. İlk 3 basamakta diosmin molekülü sentezlenir. 4.basamakta elde edilen diosmin saflaştırılır. Saflaştırma işlemi ile flavanoid fraksiyonlarının suda erimesi engellenmekte, lipofilik membranlara afinitesi artmaktadır. Elde edilen diosminin büyük moleküllerden oluşması nedeniyle barsak mukozasından emilimi çok zayıftır. Bu nedenle mikronizasyon işlemine tabi tutularak 2 mikron büyüklüğünde partiküllere dönüştürülür.

### **2.5.3. Saflaştırma işlemi**

Diosmin+Hesperidin için önemli bir özelliktir çünkü Lipofilik etkinlik kazanır. Dokulara daha iyi penetre olur, hızlı emilim ve hızlı etkinlik sağlar.

### **2.5.4. Mikronizasyon işlemi ve önemi:**

Mikronizasyon barsak mukozasından emilimi zayıf olan 60 mikron büyüklüğündeki diosmin partiküllerini 2 mikron büyüklüğünde, emilimi yüksek partiküller haline dönüştüren teknoloji işlemidir. Ses hızında çalışan hava fıskiyelerinin içinde moleküller birbirine çarparak mikronize edilir. Eşit doz non-mikronize diosminle kıyaslandığında mikronize Diosmin+Hesperidin daha hızlı emilir ve daha etkilidir <sup>(90,91)</sup>.

### **2.5.5.Farmakodinamik özellikler**

Diosmin kimyasal olarak 5,7,3-trihidroksi-4-metoksiflavon'un 7-ramnoglukozidi olarak tanımlanır. İnflamasyona bağlı olarak histamin,PGE<sub>2</sub> ve serbest radikaller hücre membran permeabilitesini artırır. Diosmin+Hesperidin fosfodiesteraz enzimini inhibe ederek hücre içi c-AMP seviyesini artırır, dolayısıyla inflamasyona sebep olan başlıca mediatörleri (PGE<sub>2</sub>,PGF<sub>2</sub>,TxB<sub>2</sub> gibi) ve serbest oksijen radikallerinin oluşunu azaltır <sup>(92)</sup>.

Diosmin venotonik ve venoprotektif, damarlarda kasıcı, damar direncini arttırıcı ve damar geçirgenliğini azaltıcı bir ajandır. Vasküler koruyucu etkisi fiziksel veya kimyasal biçimde tetiklenmiş kapiller direnç üzerine yoğunlaşmıştır. Damar koruyucu etkileri dozla orantılı olarak kapiller dirençte artış şeklindedir. Farmakolojik özellikleri arasında özellikle, venotonik etkinlik, damar sistemini koruyucu etkinlik ve antiinflamatuvar etkinlik sayılabilir. Anti-ödem etkisi antiinflamatuvar etkisinden kaynaklanmaktadır.

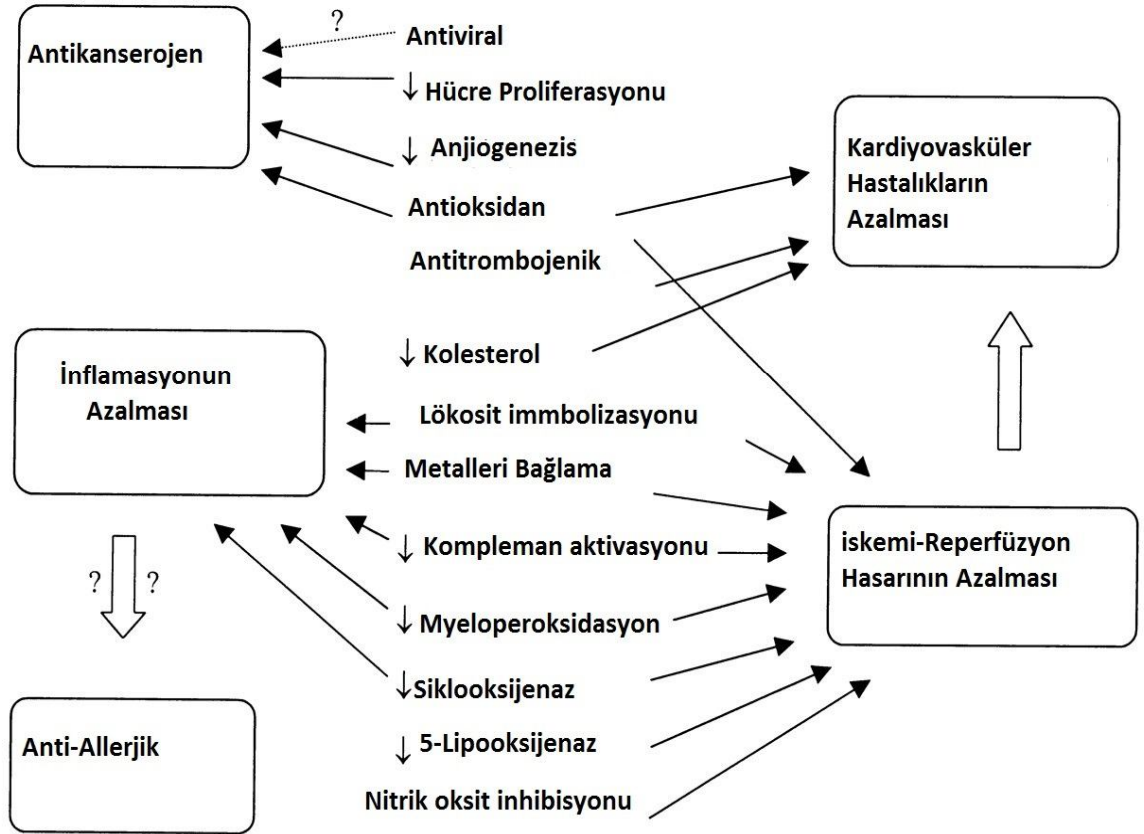
İskemi-Reperfüzyon hasarında dokularda asidoz olur. Asidoz vasküler düz kasları deprese eder. Diosmin, Catechol-O-Methyl Transferaz(COMT) aktivitesini özellikle

küçük damarlarda inhibe eder; sempatik aktiviteyi uyarıp katekolamin salınımına neden olur. Katekolaminlerin etki süresini artırarak venöz tonusu güçlendirir. Bu etkisinin venöz tonusu düşürmeye ve kronik venöz yetmezliği düzeltmeye yaradığı düşünülmektedir<sup>(93)</sup>.

İskemi-Reperfüzyon hasarında membran bütünlüğü bozulur, lipopolisakkaritlerin düzeyi artar. Diosmin+Hesperidin tirozin kinazı inhibe ederek lipopolisakkaritlerin indüklediği sitotoksisiteyi azaltır<sup>(94)</sup>.

Diosmin+Hesperidin, polimorfonükleer lökositlerin indüklediği iskemi reperfüzyon hasarında endotelden salınan interselüler adezyon molekülü 1 (ICAM-1) salınımını azaltır. Lökosit adezyon ve agregasyonunu inhibe ederek antiinflamatuvar etki gösterir<sup>(95)</sup>.

**Tablo 4.** Flavonoidlerin etki mekanizmaları.



...İskemi-Reperfüzyon hasarında endotel bütünlüğü bozular, membran lipidleri siklooksijenaz enzimi ile araşidonik asit peroksidasyonu sonucu oluşan mediatörler inflamasyona sebep olur. Diosmin+Hesperidin, siklooksijenaz enziminin bir kofaktörü olan Cu<sup>++</sup>'nin güçlü bağlayıcısıdır. Bu yol ile siklooksijenazın aktivitesini azaltarak inflamasyonu baskılar<sup>(96)</sup>.

Diosmin+Hesperidin lenfatik kanalların tonusunu artırarak, lenfatik drenajı sağlar. Doku ödemi azaltır ve dokular arasında biriken serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırmasına yardımcı olmak suretiyle iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik olumlu katkı sağlar<sup>(97)</sup>.

#### **2.5.6. Farmakokinetik özellikler:**

Ağızdan alınan diosmin hızla emilir. Emilim sadece barsaklardan gerçekleşmeyip bu basamaktan önce diosminin orta halkasının açılmasıyla gerçekleşir ve bu nedenle idrarda bulunan metabolitleri fenolik asit türevleriyle ilişkilendirilir. İnsanda, karbon 14 ile işaretli diosminin oral alımından sonra, atılımın başlıca dışkı yolu ile olduğu, böbreklerden atılımın alınan miktarın ortalama %14'ünü teşkil ettiği, atılım yarı ömrünün 11 saat olduğu ve ürünün hızla metabolize olduğu ve bu hususun idrarda fenol asitleri varlığı ile belirlendiği ortaya konmuştur. Doruk plazma konsantrasyon zamanı 1 saattir (400 ng/ml) ve plazma düzeyleri 2 saat sonra yavaş yavaş düşmeye başlar<sup>(98)</sup>.

### **3.GEREÇLER VE YÖNTEM**

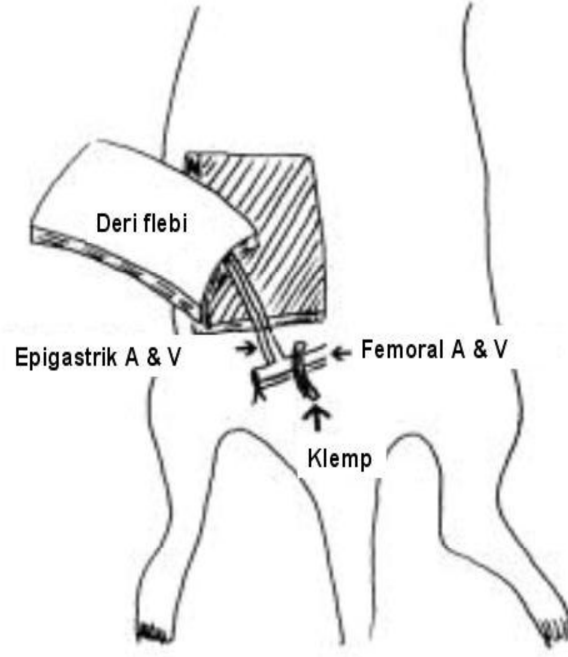
Bu deneysel çalışma Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik Kurulunun izni ile Erciyes Üniversitesi Hakan Çetinsaya Deneysel ve Klinik araştırma merkezinde 19.12.2012-19.12.2014 tarihleri arasında yapıldı. (Proje no:TTU-2012-4239). Çalışmada denek olarak ağırlıkları 320-380 gr arasında değişen 40 adet Wistar Albino cinsi erkek rat kullanıldı. Anestezi 100mg/kg ketamin ve 35mg/kg xylazine intraperitoneal verilerek sağlandı. Çalışma boyunca deney hayvanları aynı laboratuvar koşullarında, standart rat yemi ve su kullanılarak takip edildi.

#### **3.1.FLEP MODELİ**

Çalışmada Tosa ve arkadaşlarının kullandığı flep model alınarak, pedikülünde inferior epigastrik arteri içeren deri flebi kullanıldı (şekil-4) <sup>(99)</sup>. Tosa ve arkadaşları tarafından kullanılan flebin boyutları 3x4,5 idi. Bizim çalışmamızda flep modifiye edilerek 3x6 cm boyutlarında kaldırıldı. Bu modifikasyonun amacı kontrol grubunda nekroz alanını arttırıp tedavi gruplarında diosmin+Hesperidinin flep canlılığı üzerine etkisini daha net değerlendirebilmektir.Ratın abdominal bölgesi traş edildikten sonra sol abdominal bölgeden 3x6 cm'lik subkütan flep kaldırıldı. Flebin kaudalinde flebe giren inferior epigastrik arter ve ven iskeletize edildi ve korundu. Flep ada haline getirildi. Pedikülün distalindeki femoral arter ve ven bağlanarak kesildi. Femoral arter ve venin muskuler, safenöz ve popliteal dalları bağlanarak kesildi. Böylece flep sadece femoral damarın süperfisyel epigastrik dalından beslenecek hale getirildi (şekil-3). Femoral damarlar mikroklemple klemplenerek 9 saat iskemi uygulandı.

### 3.2.DİOSMİN +HESPERİDİNİN UYGULANMA ŞEKLİ

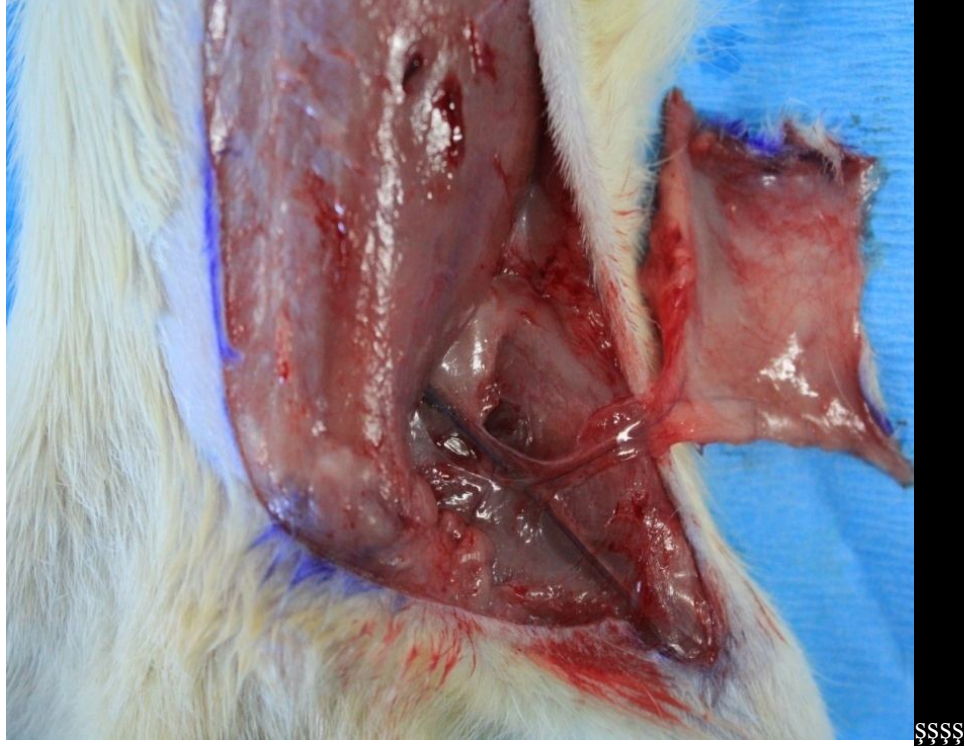
Ratlara 20 gauge iğne ucuyla 20 ml/kg olacak şekilde Diosmin+Hesperidin gavaj yöntemiyle verildi.



**Şekil 3.** İnförör epigastrik ada flebin seki<sup>(99)</sup>.



**Şekil 4.** Preoperatif Flep Çizimi.



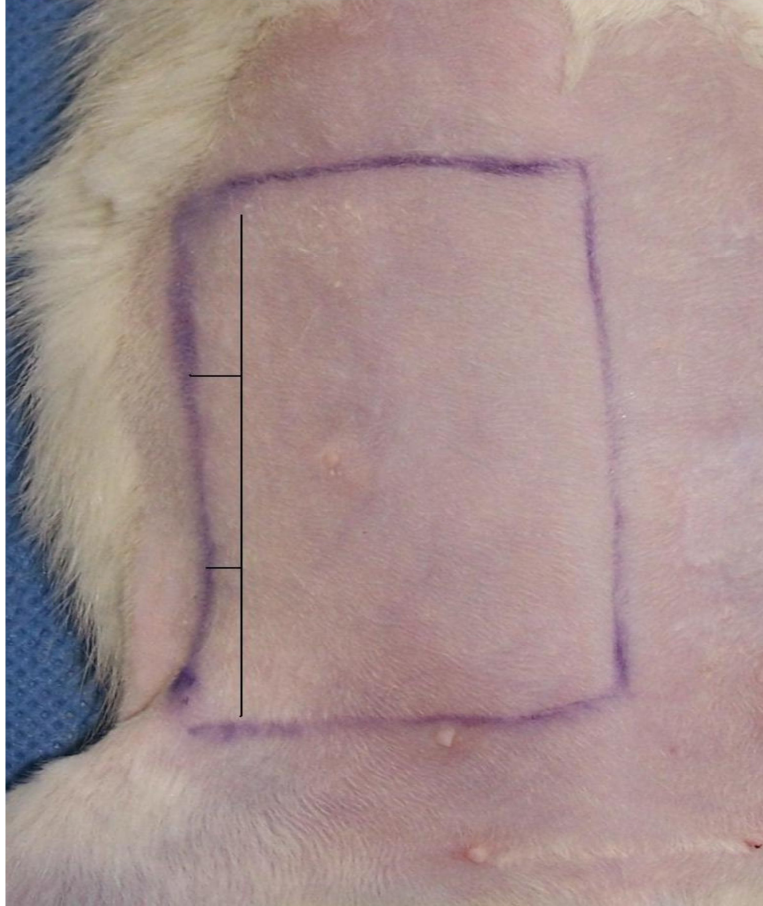
**Şekil 5.** Flep elevasyonu



**Şekil 6.** Flep Pediklülünde İskemi

### 3.3. DENEY PLANI

Denekler 4 gruba ayrıldı, 1. grup sham grubu (n=10), 2. grup kontrol grubu (n=10), 3. grup T-1 grubu (n=10), 4. grup T-2 grubu (n=10) olarak planlandı. Tüm fleplerden 21. saatte flebin pediküle yakın uzun kenarından longitudinal olarak 0,5 cm genişliğinde şerit olarak doku çıkarıldı. Çıkarılan materyalin orta 1/3 kısmından 3 adet doku örneği alındı. Biyopsi alınan bölge şekil 4’de gösterilmektedir. Alınan doku örnekleri hücre infiltrasyonunu ve damar çaplarını histolojik olarak göstermek için ve lipid yıkım ürünlerini (malondialdehit) ve nötrofil akümüülasyonunu (myeloperoksidaz düzeyi) biyokimyasal olarak göstermek için ayrıldı. Biyokimyasal çalışma için örnekler -20 °C de saklandı. Histolojik çalışma için örnekler oda sıcaklığında formaldehit içinde saklandı. Deney planı tablo-4’de açıklanmıştır.



**Sekil 7.** Orta 1/3’lük kısım doku örneği

**Tablo 5.** Deney planı

İşlemler/Gruplar	Sham(n=10)	Kontrol(n=10)	Ted.-1(n=10)	Ted.-2(n=10)
Flep elevasyonu	+	+	+	+
İskemi (9 saat)	-	+	+	+
Tedavi (gavaj)	0,2 cc normal salin	0,2 cc normal salin	30mg/kg Diosmin+Hesperidin	80mg/kg Diosmin+Hesperidin
Reperfüzyon (12 saat)	-	+	+	+
Biyopsi alımı (21. saat)	+	+	+	+
Flep canlılığı ölçümü (7.gün)	+	+	+	+

### 3.3.1. Sham grubu;

Bu gruptaki 10 ratta 6x3 cm abdominal epigastrik flep kaldırıldıktan sonra pedikül korundu. İskemi yapılmadı. Flep 3/0 ipekle yerine suture edildi. 21 saat sonra flep orta bölümünden üç adet biyopsi alındı. Biyopsi alınan bölgedeki defekt 3/0 ipekle primer kapatıldı. Flep kaldırıldıktan yedi gün sonra yasayan flep alanı transparan asetat üzerinde çizilerek belirlendi.

### 3.3.2. Kontrol grubu

Bu gruptaki 10 ratta flep kaldırıldıktan sonra femoral damarlar mikrovasküler Acland klemple (B-2V; S&T Market-. ing Ltd, Neuhausen, Switzerland) klemplenerek 9 saat iskemiye maruz bırakıldı. Dokuz saat sonra sütürler açılıp mikroklemple çıkarıldı ve reperfüzyon yapıldı. Flep 3/0 ipekle tekrar yerine suture edildi. Reperfüzyondan 12 saat sonra flep orta bölümünden üç adet biyopsi alındı. Doku örnekleri histolojik ve



biyokimyasal çalışma için ayrıldı ve -20 °C de saklandı. Yedinci gün transparan asetat üzerinde flep sağ kalımı çizilerek belirlendi.

### **3.3.3. Tedavi-1 grubu**

Bu gruptaki 10 rata preoperative 10 gün süreyle sabah ve akşam 2 doz toplamda 30mg/kg Diosmin+Hesperidin gavaj ile verildi. 10. gün flepler kaldırılıp yeterli diseksiyonla pedikül ortaya konduktan sonra pedikül klemlenerek 9 saat iskemiye maruz bırakıldı. 9 saat sonra mikroklemp açılarak reperfüzyon sağlandı. Flepler 3/0 ipekle tekrar yerlerine suture edildi. Diosmin+Hesperidin dozu ratlarda yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılan dozlar göz önüne alınarak belirlendi. Oniki saatlik reperfüzyondan sonra flep orta bölümünden histolojik çalışma ve biyokimyasal çalışmalar için doku örnekleri alındı. Cerrahi sonrası ratlara bir hafta süreyle sabah ve akşam gavaj yolu ile toplamda 30mg/kg Diosmin+Hesperidin verildi. Yedinci gün flep sağ kalımı transparan asetat üzerinde çizilerek belirlendi.

### **3.3.4. Tedavi-2 grubu**

Bu gruptaki 10 rata preoperative 10 gün süreyle sabah ve akşam 2 doz toplamda 80mg/kg diosmin+Hesperidin gavaj ile verildi. 10. gün flepler kaldırılıp yeterli diseksiyonla pedikül ortaya konduktan sonra pedikül klemlenerek 9 saat iskemiye maruz bırakıldı. 9 saat sonra mikroklemp açılarak reperfüzyon sağlandı. Flepler 3/0 ipekle tekrar yerlerine suture edildi. Diosmin+Hesperidin dozu ratlarda yapılan çeşitli çalışmalarda kullanılan dozlar göz önüne alınarak belirlendi. Oniki saatlik reperfüzyondan sonra flep orta bölümünden histolojik çalışma ve biyokimyasal çalışmalar için doku örnekleri alındı. Cerrahi sonrası ratlara bir hafta süreyle sabah ve akşam gavaj yolu ile toplamda 80mg/kg Diosmin+Hesperidin verildi. Yedinci gün flep sağ kalımı transparan asetat üzerinde çizilerek belirlendi.

## **3.4. FLEP CANLILIK ORANLARININ BELİRLENMESİ**

Yedinci gün fleplerde nekrotik ve canlı alanların belirginleştiği görüldü. Transparan asetat üzerine canlı ve nekrotik alanlar çizildi. Çizilen alanlar birim kareler üzerinde sayılarak canlı alan, total flep alanına bölünerek fleplerde sağ kalım oranı hesaplandı.

### 3.5. HİSTOLOJİK ANALİZ

Spesmenler % 10 luk formaldehit içerisinde tespit edildi. Parafine yerleştirildi. Dört mikron kalınlığında kesitler alındı ve hematoksilin eozinde (HE) boyandı. Işık mikroskopuyla tüm kesitler, 100'lük büyütmede nötrofil sayımı için ve 200'lük büyütmede damar çapları ölçümü için değerlendirildi. Nötrofil sayımı ve damar çapları beş farklı sahadaki değerlerin ortalaması alınarak hesaplandı.

### 3.6. BİYOKİMYASAL ANALİZ:

Rat deri dokuları %10 (w/v) olacak şekilde pH 7.4 fosfat tamponu içinde homojenizatörle homojenize edildi. Homojenizasyon 10.000 g de santrifüj edildi ve süpernatanttan, malondialdehit (MDA) ve Myeloperoksdaz (MPO) düzeyleri tayin edildi.

#### 3.6.1. Malondialdehit (MDA) Tayini:

Lipid peroksidasyonunun yıkım ürünlerinden olan MDA'nın ölçümünde kullanılan spektrofotometrik metotların büyük bir kısmı, MDA'nın, tiyobarbitürik asit (TBA) ile reaksiyona girerek, 532 nm dalga boyunda maksimum absorbanans veren pembe renkli bir kompleks oluşturması prensibine dayanmaktadır <sup>(141)</sup>. Akciğer, karaciğer ve böbrek dokusu MDA tayininde, Ohkawa ve ark.'nın geliştirdiği metot kullanıldı <sup>(142)</sup>.

Çalışma: MDA ölçümü yapılacak her numune için kullanılacak olan kimyasallar ve işlem sırası Tablo-5'de verildiği gibi hazırlandı.

**Tablo 6.** Ohkawa ve ark. geliştirdiği metoda göre MDA tayininde kullanılan kimyasallar

Süpernatant	0,1 mL
%8,1 Sodyum dodesil sülfat	0,1 mL
%20 Asetik asit (pH3.5)	0,75 mL
%0,8 Tiyobarbitürik asit	0,75 mL
Distile H <sub>2</sub> O	0,3 mL
95 <sup>0</sup> C sıcak su banyosunda 60 dakika kaynatıldı	
Distile H <sub>2</sub> O	0,5 mL
n-butanol/piridin (15:1)	2,5 mL
4 <sup>0</sup> C'de 4000 rpm'de 15 dakika santrifüje edildi	

Süpernatantlardan 0.1 mL alınıp kapaklı cam tüplere konuldu. Üzerlerine sırasıyla 0,1 mL sodyum dodesil sülfat (%8,1), 0,75 mL asetik asit (%20: pH 3,5), 0,75 mL tiyobarbitürik asit (%0,8) ve 0,3 mL dH<sub>2</sub>O eklenerek iyice karıştırıldıktan sonra ağızları sıkıca kapatılan tüpler, 95<sup>0</sup>C sıcak su banyosunda 60 dakika kaynatıldı. Kapakları açılarak soğutulan tüplere, 0,5 mL distile H<sub>2</sub>O ve 2,5 mL n-butanol/piridin (15:1) karışımı eklenerek vorteksle iyice karıştırıldı. Tüplerin 4<sup>0</sup>C'da 4000 rpm'de 15 dakika santrifüj edilmesi ile elde edilen pembe organik fazın absorbansı, 532 nm'de, distile su ile aynı şekilde çalışılan köre karşı ölçüldü. Değerlendirme standart eğri üzerinde yapıldı.(Tablo-5)

Standart eğriden elde edilen doku MDA seviyeleri (nmol/mL), aynı süpernatantlarda Bradford yöntemi <sup>(143)</sup> ile ölçülen miligram protein başına verildi (nmol MDA/ mg protein).

### **3.6.2. Myeloperoksidaz (MPO) tayini**

Eastbiopharm marka katalog no: CK-E30220 Rat Myeloperoksidaz (MPO) Elisa Kit ile ölçüldü.

### **3.7. İSTATİSTİKSEL YÖNTEM**

Verilerin dağılımına Shapiro Wilks test istatistiği ile bakılmıştır. Gruplar arası karşılaştırmada tek yönlü varyans analizi (ANOVA) kullanıldı. Çoklu karşılaştırma testlerinden Tukey testi kullanılmıştır. Nicel değişkenler arasındaki ilişkinin yönünü kuvvetini belirlemek için Pearson Korelasyon analizi kullanılmıştır. Bu çalışma IBM-SPSS 22 programında yapılmıştır. Anlamlılık p<0,05 olarak kabul edilmiştir.

Tüm gruplarda (sham,kontrol,tedavi-1 ve tedavi-2) her bir parametrenin (damar çapı,nötrofil sayısı, malondialdehit düzeyi, myeloperoksidaz düzeyi ve flep canlılığı) birbirleriyle olan ilişkinin yönünü ve gücünü belirlemede Spearman's korelasyon analizi yapıldı.

## 4. BULGULAR

### 4.1.FLEP CANLILIK ORANLARI

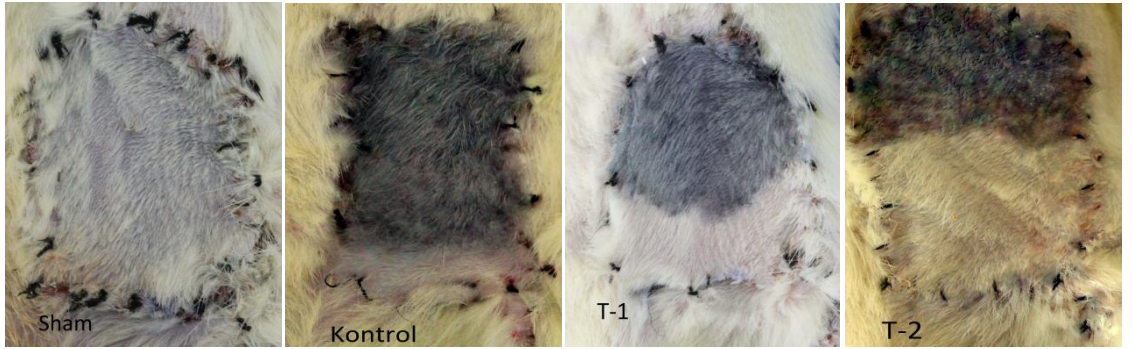
Yedinci gün transparan asetat üzerine çizilen birim karelerden fleplerin nekroz ve canlı alanları işaretlendi. Asetat üzerinde flepte canlı görünen birim kareler sayılarak tüm flep alanındaki birim karelere oranlanıp 100 ile çarpılmasıyla, yüzde olarak canlılık oranları hesaplandı. Flep yaşam oranları herbir grup için tablo-6 da gösterilmiştir.

**Tablo 7.** Flep canlılık oranları

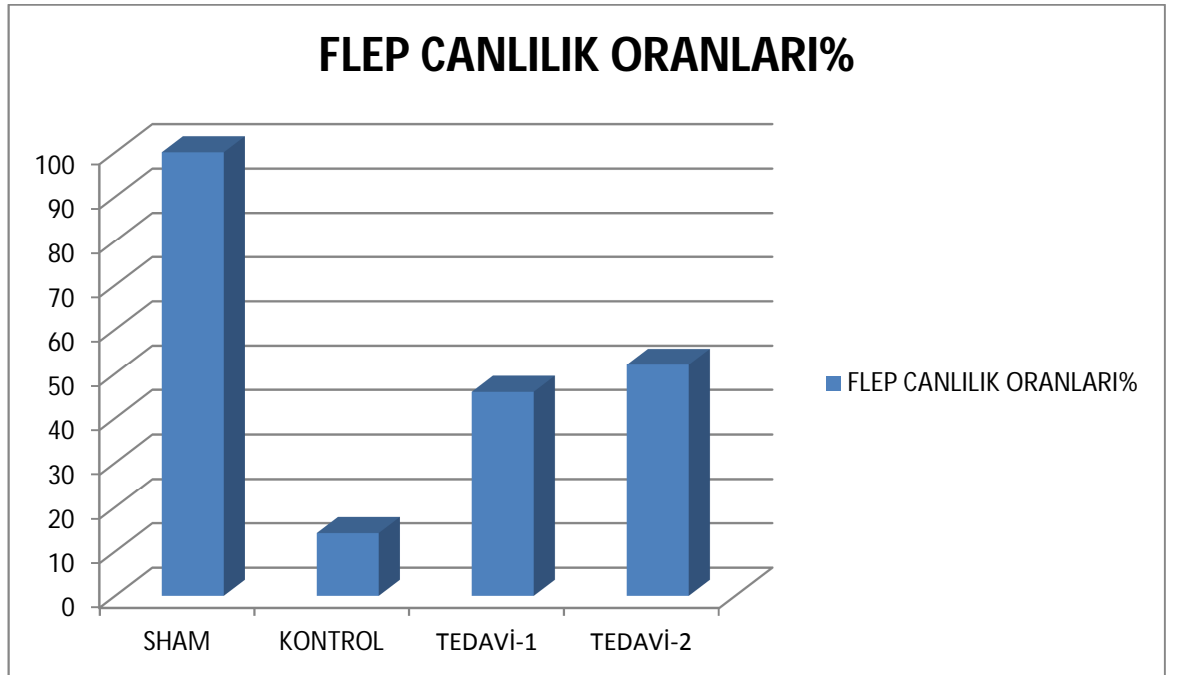
	Sham grubu (n=10)	Kontrol grubu (n=9)	Ted.-1 grubu (n=8)	Ted.-2 grubu (n=8)
1	100	0	59,5	31,5
2	100	0	---	74,5
3	100	0	64	---
4	100	42	32,5	32,5
5	100	0	56	37,5
6	100	15	49,5	67,5
7	100	0	47,5	60,5
8	100	---	---	54
9	100	37,5	23,5	---
10	100	32,5	34,5	58
<b>Ort ± SD</b>	<b>100±0</b>	<b>14,11±18,23</b>	<b>45,87±14,34</b>	<b>52±16,34</b>

Kontrol grubunda bir rat öldüğü için dokuz rat degerlendirmeye alındı.Tedavi 1 ve Tedavi-2 gruplarında ikişer rat fleplerini yediği için değerlendirme yapılamadı.Bu sonuçlara göre ortalama canlılık oranı; Sham grubunda  $100\pm 0$ , Kontrol grubunda  $14,11\pm 18,23$ , T-1 grubunda  $45,87\pm 14,34$ , T-2 grubunda  $52\pm 16,34$  olarak bulundu.

Gruplar arasında Sham grubu hariç tutulup ortalama canlılık oranları karşılaştırıldığında,T-1 ve T-2 grubundaki flep canlılık oranı, Kontrol grubundan anlamlı şekilde yüksek bulundu (  $p<0,05$  ). Tedavi grupları arasında fark yoktu. Her gruba ait flep yaşam oranlarını gösteren birer adet örnek fotoğraf gösterilmiştir ( Şekil - 5).



Şekil 8. Gruplara ait flep yaşam oranı örnekleri.



Grafik 1. Flep canlılık oranları.

#### 4.2.NÖTROFİL SAYIMI

Nötrofil sayımı 100 büyük büyütme sahasında yapıldı ve beş farklı alanda ölçülen değerlerin ortalaması alındı. Bu sonuçlara göre grupların ortalama nötrofil sayısı; Sham grubunda  $11,1\pm 3,7$  Kontrol grubunda  $50,4\pm 19,7$ , T-1 grubunda  $27,6\pm 11,5$ , T-2 grubunda  $25,1\pm 7,8$  olarak bulundu (Tablo-7).

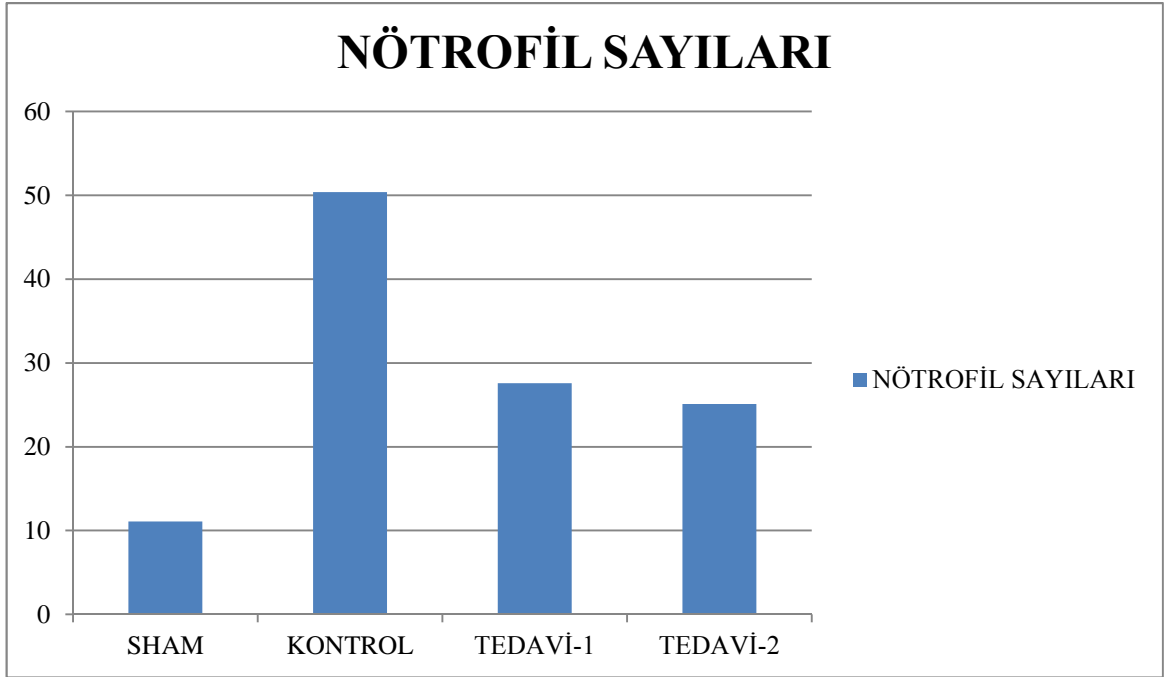
Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında; nötrofil sayısı, Kontrol, T-1 ve T-2 gruplarında Sham grubuna göre anlamlı derecede yüksek seviyede bulundu (Grafik-2).

Kontrol grubu, tedavi gruplarıyla karşılaştırıldığında tedavi-1 grubuna göre p değeri ( $p<0,001$ ) anlamlı derecede yüksek seviyede bulundu. Kontrol grubu tedavi-2 grubuyla karşılaştırıldığında p değeri ( $p=0,001$ ), anlamlı derecede yüksek bulundu.

Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı fark bulunamamıştır ( $p<0,05$ ). Teknik nedenlerden dolayı kontrol grubundaki bir numune değerlendirilmeye alınamadı.

**Tablo 8.** Nötrofil Sayıları

	SHAM GRUBU	KONTROL GRUBU	TEDAVİ 1 GRUBU	TEDAVİ 2 GRUBU
1	12	78	34	38
2	8	56	18	34
3	16	62	28	20
4	6	32	32	16
5	17	48	16	21
6	8	34	22	32
7	14	80	48	26
8	8	-	12	14
9	10	36	42	28
10	12	28	24	22
Ort±SD	$11,1\pm 3,7$	$50,4\pm 19,7$	$27,6\pm 11,5$	$25,1\pm 7,8$



**Grafik 2.** Nötrofil Sayıları

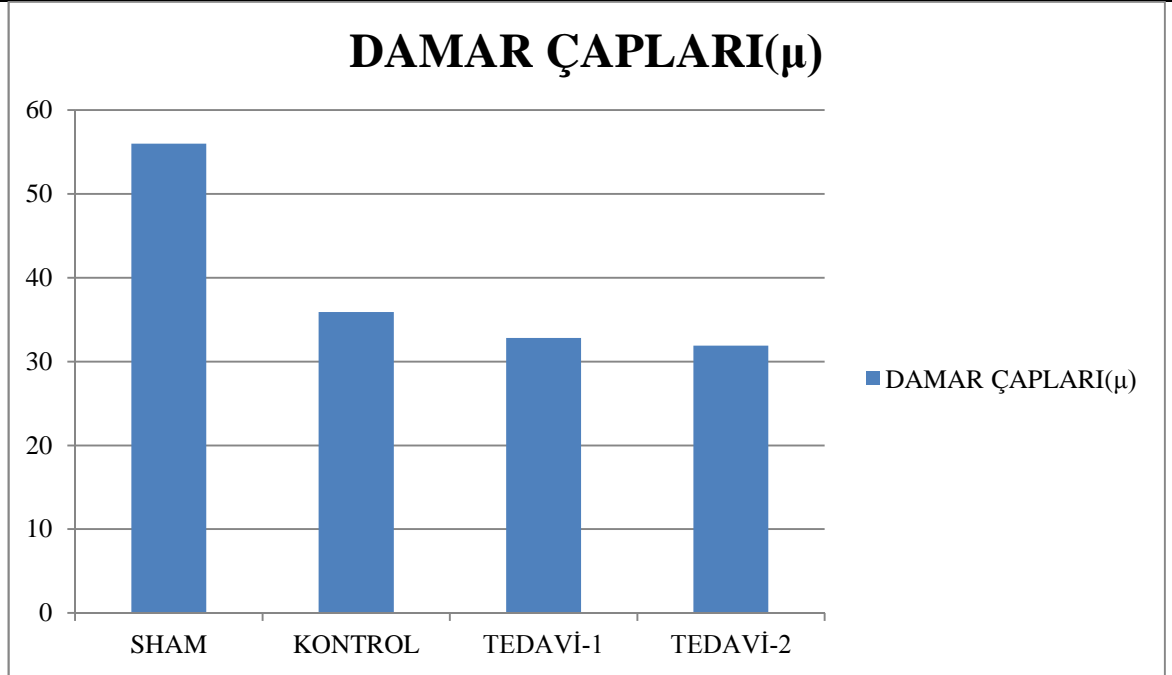
### 4.3.DAMAR ÇAPLARI ÖLÇÜMÜ

Damar çapları 200 büyük büyütme alanında ve beş farklı sahada bakıldı, mikron olarak ölçüm yapıldı. Ölçülen damarların ortalama değeri alındı. Bu sonuçlara göre gruptaki ortalama damar çapları; Sham grubunda  $56 \pm 13,5 \mu$ , Kontrol grubunda  $35,9 \pm 13 \mu$ , T-1 grubunda  $32,8 \pm 6,3 \mu$ , T-2 grubunda  $31,9 \pm 9,5 \mu$  olarak bulundu (Tablo-8).

Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, damar çapları Kontrol, T-1 ve T-2 gruplarından Sham grubuna göre anlamlı derecede ( $p < 0,05$ ) küçüktü. Kontrol grubunda ortalama damar çapları T-1 ve T-2 gruplarından büyük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. T-1 grubunda damar çapları ortalaması T-2 grubunda büyük olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Teknik nedenlerden dolayı kontrol grubundaki bir numune değerlendirilmeye alınmadı.

**Tablo 9.** Gruplarda Damar çapları ( $\mu$ )

	<b>SHAM GRUBU</b>	<b>KONTROL GRUBU</b>	<b>TEDAVİ -1 GRUBU</b>	<b>TEDAVİ-2 GRUBU</b>
1	32,3	33,3	24	23
2	48	24,8	23,8	26,2
3	70	48	42	34
4	74	49,7	40	32
5	46	20,1	30,4	24,6
6	60	21	36,6	43
7	58,2	28	38	52,1
8	55	-	34,4	34
9	44,7	46,2	30	28
10	71,8	52	29	22,3
Ort $\pm$ SD	56 $\pm$ 13,5	35,9 $\pm$ 13	32,8 $\pm$ 6,3	31,9 $\pm$ 9,5



**Grafik 3.** Damar çapları( $\mu$ )

#### 4.4. MALONDİALDEHİT DÜZEYİ

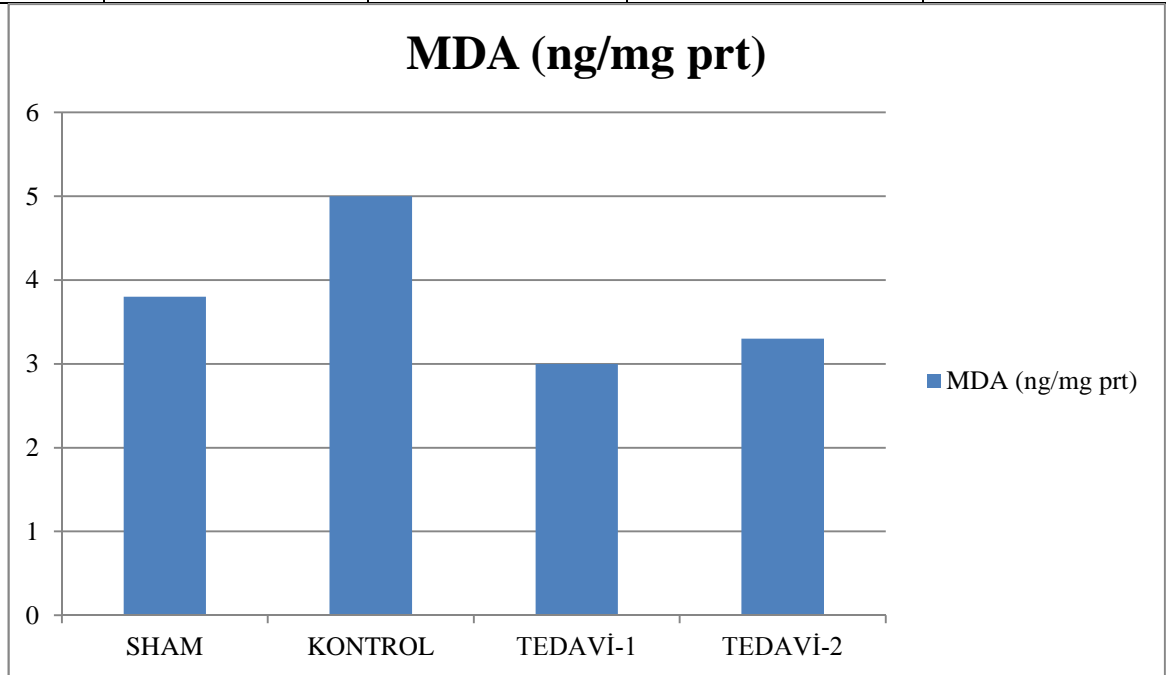
Ortalama MDA düzeyleri; Sham grubunda  $3,8 \pm 0,8$  nmol/mg protein, Kontrol grubunda  $5,03 \pm 2,5$  nmol/mg protein, T-1 grubunda  $3,01 \pm 1,1$  nmol/mg protein, T-2 grubunda  $3,3 \pm 0,9$  nmol/mg protein olarak bulundu (Tablo-9). Sham grubunda bir, tedavi-1 grubunda iki ve tedavi-2 grubunda 3 örnek incelemeye uygun olmadığından değerlendirmeye alınmamıştır. Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında, MDA düzeyi T-



1,T-2 ve sham grubunda kontrol grubuna göre daha düşük seviyede bulundu. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı fakat p değeri(0.067) anlamlı değere yakın bulundu. Sham grubunda bir, tedavi-1 grubunda iki ve tedavi-2 grubunda üç numune incelemeye uygun bulunmadığı için değerlendirmeye alınmadı.

**Tablo 10.** MDA düzeyleri.

	<b>SHAM GRUBU</b>	<b>KONTROL GRUBU</b>	<b>TEDAVİ 1 GRUBU</b>	<b>TEDAVİ 2 GRUBU</b>
1	2,83	2,75	2,71	---
2	4,07	9,90	3,85	2,82
3	3,70	1,90	4,39	----
4	----	7,60	1,17	2,20
5	3,40	4,80	3,88	5,10
6	4,40	3,20	---	3,70
7	2,80	6,90	---	3,69
8	5,03	2,50	3,93	3,08
9	3,30	5,90	1,99	2,98
10	5,07	4,40	2,20	---
Ort±SD	3,8 ±0,8 nmol/mg protein	5,03±2,5 nmol/mg protein	3,01±1,1 nmol/mg protein	3,3±0,9 nmol/mg protein



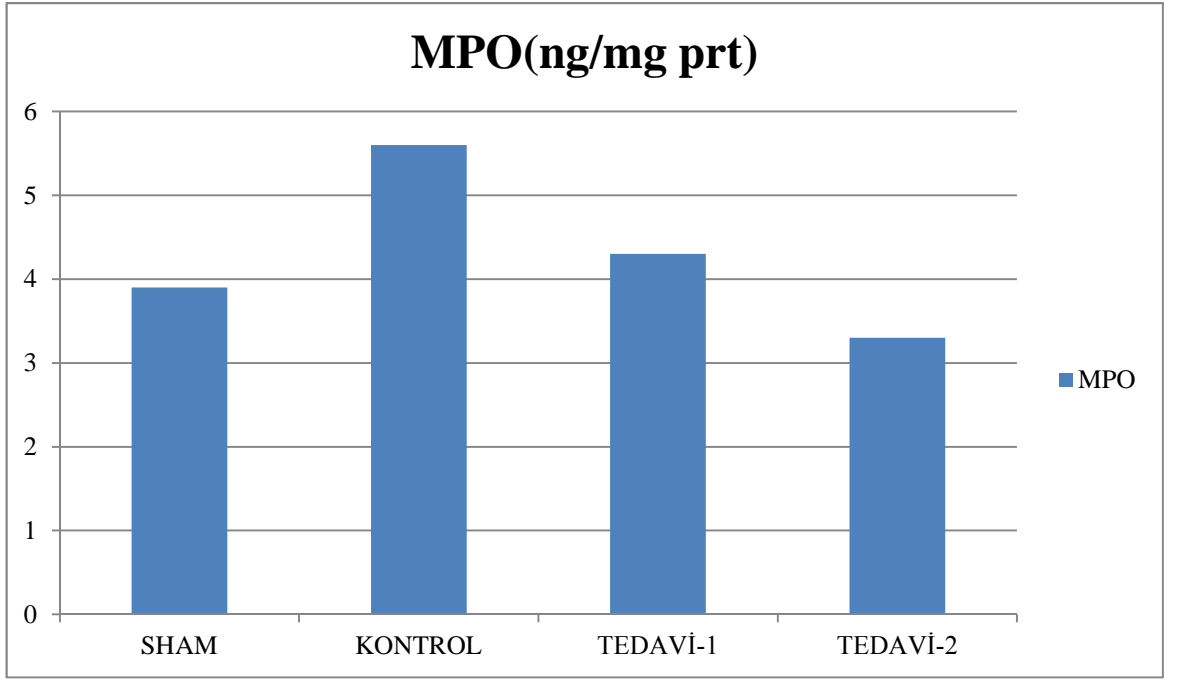
**Grafik 4.** MDA düzeyleri

#### 4.5. MYELOPEROKSİDAZ DÜZEYİ:

Grupların ortalama MPO düzeyi; Sham grubunda  $3,9\pm1,5$  ng/mg protein, Kontrol grubunda  $5,6\pm1,9$  ng/mg protein, T-1 grubunda  $4,3\pm0,8$  ng/mg protein, T-2 grubunda  $3,9\pm1,4$  ng/mg protein olarak bulundu (Tablo-10). Gruplar arası karşılaştırma yapıldığında sham T-1 ve T-2 gruplarında kontrol grubuna göre MPO düzeyi daha düşük seviyede ölçüldü. İstatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı fakat p değeri (0.077) anlamlı değere yakın bulundu ( $p<0,005$ ). Sham grubunda bir, kontrol tedavi-1 ve tedavi-2 gruplarında ikişer numune incelemeye uygun bulunmadığı için değerlendirmeye alınmadı.

**Tablo 11.** MPO düzeyleri.

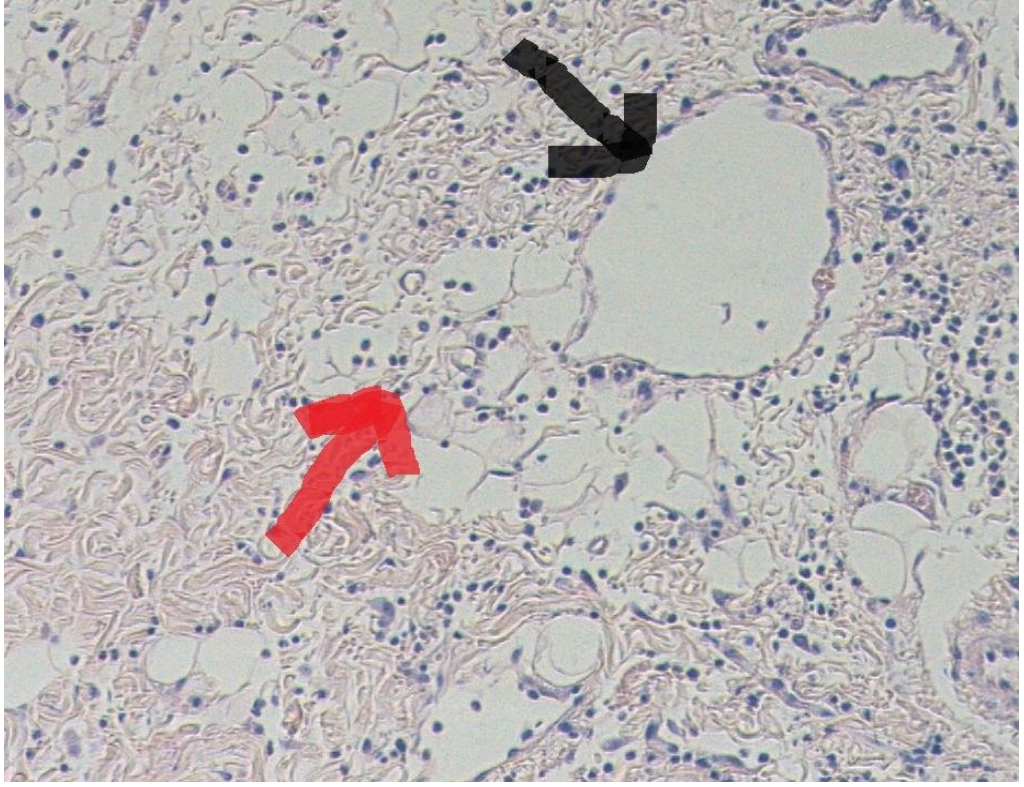
	<b>SHAM GRUBU</b>	<b>KONTROL GRUBU</b>	<b>TEDAVİ 1 GRUBU</b>	<b>TEDAVİ 2 GRUBU</b>
1	3,05	----	4,34	2,95
2	3,90	5,30	3,80	----
3	3,60	7,01	4,86	<b>2,78</b>
4	2,91	-----	3,24	<b>6,45</b>
5	6,10	7,57	----	<b>4,76</b>
6	2,58	3,97	4,51	<b>3,22</b>
7	1,88	8,94	----	-----
8	6,06	4,28	5,86	<b>5,61</b>
9	5,26	4,74	3,46	<b>2,45</b>
10	----	3,76	4,77	<b>3,47</b>
Ort±SD	$3,9\pm1,5$ ng/mg protein	$5,6\pm1,9$ ng/mg protein	$4,3\pm0,8$ ng/mg protein	$3,9\pm1,4$ ng/mg protein



**Grafik 5.** MPO düzeyleri.

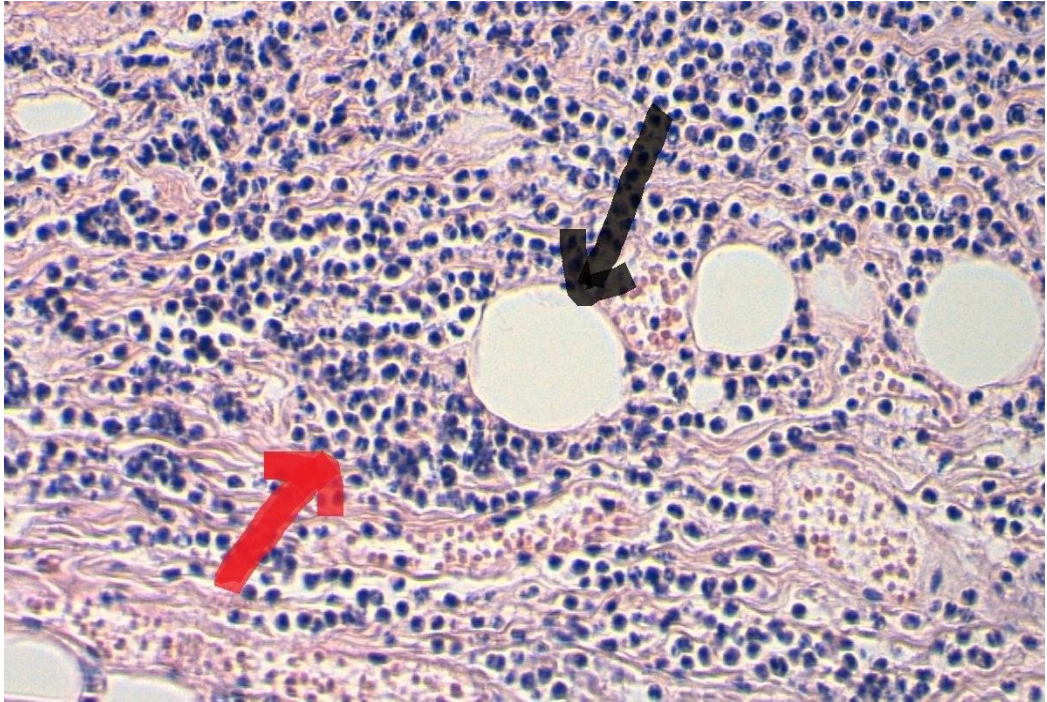
### **HİSTOLOJİK ÇALIŞMA**

Hematoksilen eozinle (HE) boyanmış kesitlerde 100'lük büyütmede nötrofil sayımı ve 200'lük büyütmede damar çapı ölçümü yapıldı. Bes farklı alanda ölçülen değerlerin ortalaması alındı. Sekil-14 de Sham grubu, sekil-15'de Kontrol grubu, sekil-16'da T-1 grubu, sekil-17'de T-2 grubuna ait histolojik görüntülere birer örnek izlenmektedir. Sham grubunda belirgin damar çapı varlığı ve nötrofil yoğunluğunun fazla olmadığı dikkat çekmektedir. Kontrol grubunda büyük çaplı damar varlığı olmadığı ve nötrofil yoğunluğu dikkat çekmektedir. T-1 grubunda büyük çaplı damar varlığı olmadığı ve nötrofil yoğunluğu dikkat çekmektedir. T-2 grubunda büyük çaplı damar varlığı olmadığı ve nötrofil yoğunluğu dikkat çekmektedir.



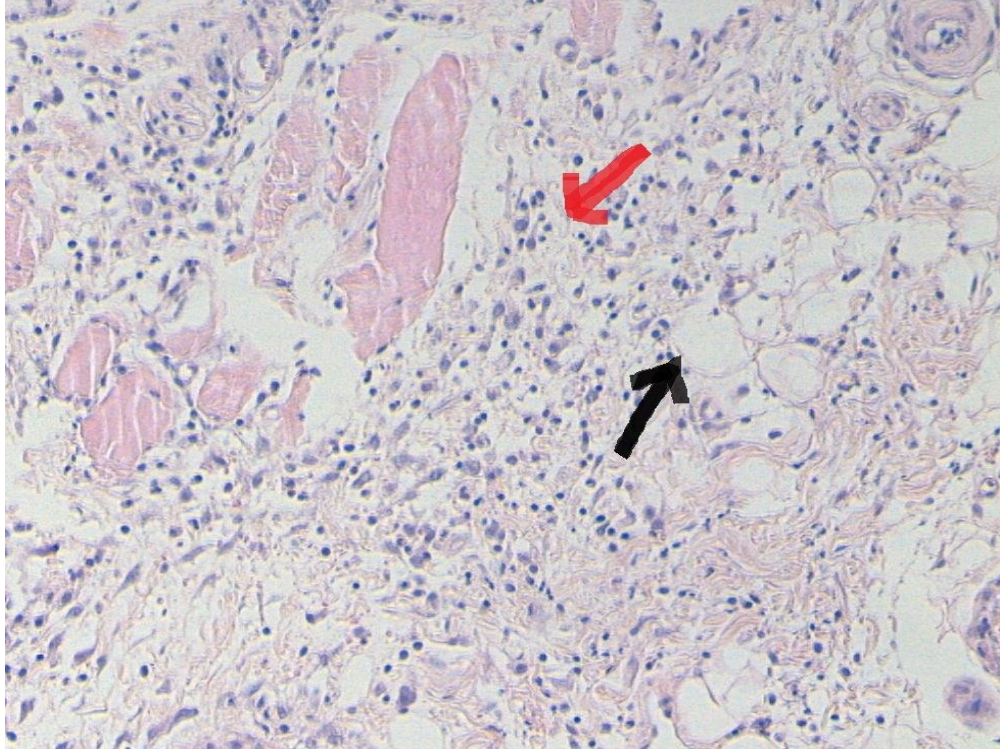
**Şekil 9.** Sham grubunda damar çapları ve nötrofil infiltrasyonu.

Kırmızı ok ile nötrofil infiltrasyonunu, siyah ok ile damar çapı gösterilmiştir.



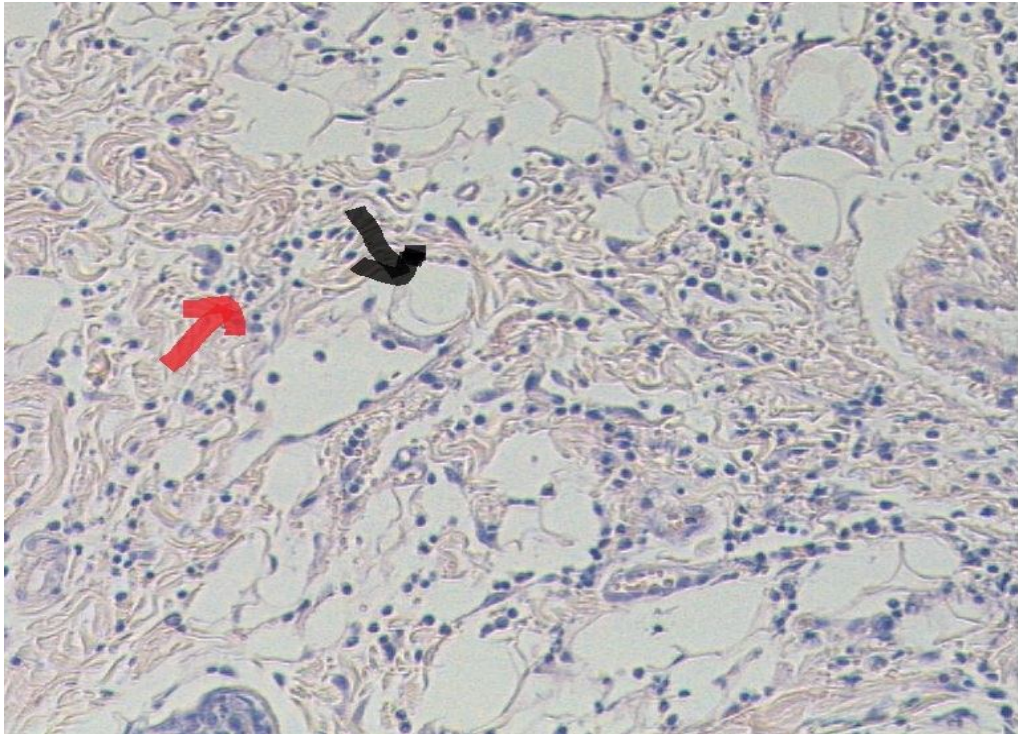
**Şekil 10.** Kontrol grubunda nötrofil infiltrasyonu ve damar çapları

Kırmızı ok nötrofil yoğunluğunu, siyah ok damar yapısını göstermektedir.



Şekil 11. Tedavi-1 grubunda nötrofil infiltrasyonu ve damar çapları gösterilmiştir.

Kırmızı ok nötrofil yoğunluğunu, siyah ok damar yapısını göstermektedir.



Şekil 12. Tedavi-2 grubunda nötrofil infiltrasyonu ve damar çapları gösterilmiştir.

Kırmızı ok nötrofil yoğunluğunu, siyah ok damar yapısını göstermektedir.

**Tablo 12.** İstatistiksel Değerlendirme Sonuçları Genel Tablosu

Değişkenler:	GRUPLAR:				P DEĞERİ
	SHAM GRUBU Ort±SD	KONTROL GRUBU Ort±SD	TEDAVİ-1 GRUBU(T1) Ort±SD	TEDAVİ-2 GRUBU(T2) Ort±SD	
1-Damar Çapı	56 ± 13,5	35,9 ± 13	32,8 ± 6,3	31,9 ± 9,5	P<0,001 *
2-Nötrofil Sayısı	11,1 ± 3,7	50,4 ± 19,7	27,6 ± 11,5	25,1 ± 7,8	P<0,001**
3-MDA Değeri (Malondialdehit)	3,8 ± 0,8	5 ± 2,5	3 ± 1,1	3,3 ± 0,9	P=0,067
4-MPO Değeri (Myeloperoksidaz)	3,9 ± 1,5	5,6 ± 1,9	4,3 ± 0,85	3,9 ± 1,4	P=0,077
5-Flep Canlılık Oranları	100 ± 0	14,1 ± 18,2	45,8 ± 14,3	52 ± 16,3*	P<0,001***

Anlamli kabul edilen p değeri: p<0,005

\*damar çapı: Sham-Kontrol, Sham-T1, Sham-T2 →Grupları arasında anlamlı fark vardır

\*\*Nötrofil sayısı: Sham-Kontrol, Sham-T1, Sham-T2,Kontrol-T1,Kontrol-T2 →Grupları arasında anlamlı fark vardır.

\*\*\*Flep Canlılık: Sham-Kontrol, Sham-T1, Sham-T2,Kontrol-T1,Kontrol-T2 →Grupları arasında anlamlı fark vardır.

#### 4.6. FLEP CANLILIĞI, MDA, MPO VE DAMAR ÇAPLARI ARASINDAKİ İLİŞKİLER:

Tüm gruplarda flep canlılığı ile damar çapı arasındaki ilişki incelendiğinde, orta derecede pozitif korelasyon bulundu ( $\rho=0,587$ ,  $p<0,001$ ) (Tablo-12).

Tüm gruplarda flep canlılığı ile nötrofil sayısı arasındaki ilişki incelendiğinde, çok güçlü negatif korelasyon bulundu ( $\rho = -0,815, p < 0,001$ ) (Tablo-12).

Tüm gruplarda flep canlılığı ile MPO arasındaki ilişki incelendiğinde, orta derecede negatif korelasyon bulundu. ( $\rho = -0,40, p = 0,035$ ) (Tablo-12).

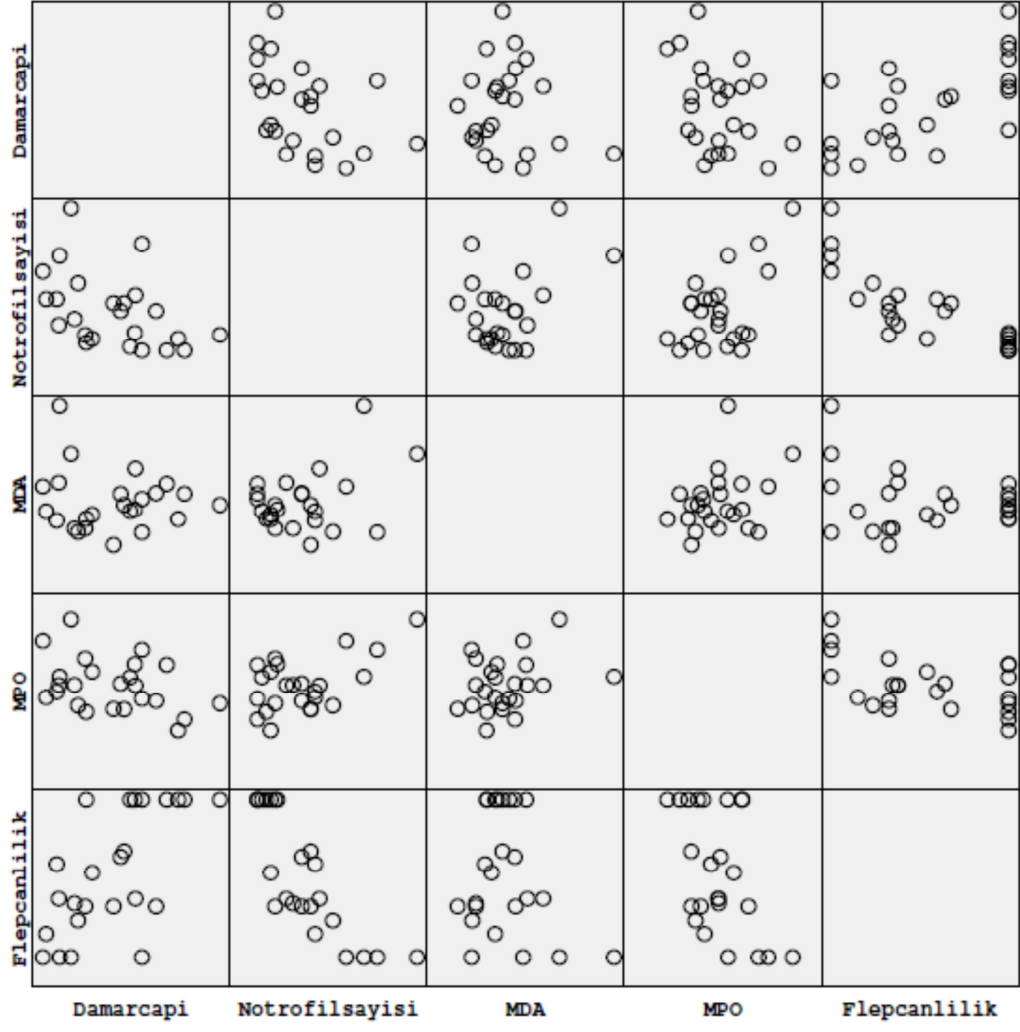
Tüm gruplar da flep canlılığı ile MDA arasındaki ilişki incelendiğinde, anlamlı kabul edilecek bir korelasyon bulunmamıştır. ( $\rho = 0,071, p = 0,707$ ) (Tablo-12).

Tüm gruplarda damar çapı ile nötrofil sayısı arasındaki ilişki incelendiğinde, orta derecede negatif korelasyon bulundu ( $\rho = -0,474, p = 0,002$ ) (Tablo-12).

**Tablo 13.** Spearman's Korelasyon Analizi

Değişkenler:	Damar Çapı	Nötrofil sayısı	MDA (Malondialdehit)	MPO (Myeloperoksidaz)	Flep Canlılık
Damar Çapı	1	$\rho = -0,474^*$ $P = 0,002^{**}$	$\rho = 0,148$ $P = 0,411$	$\rho = -0,159$ $P = 0,385$	$\rho = 0,587^*$ $P < 0,001^{**}$
Nötrofil sayısı	$\rho = -0,474^*$ $P = 0,002^{**}$	1	$\rho = -0,077$ $P = 0,670$	$\rho = 0,213$ $P = 0,242$	$\rho = -0,815^*$ $P < 0,001^{**}$
MDA (Malondialdehit)	$\rho = 0,148$ $P = 0,411$	$\rho = -0,077$ $P = 0,670$	1	$\rho = 0,249$ $P = 0,201$	$\rho = 0,071$ $P = 0,707$
MPO (Myeloperoksidaz)	$\rho = -0,159$ $P = 0,385$	$\rho = 0,213$ $P = 0,242$	$\rho = 0,249$ $P = 0,201$	1	$\rho = -0,40^*$ $P = 0,035^{**}$
Flep Canlılık	$\rho = 0,587^*$ $P < 0,001^{**}$	$\rho = -0,815^*$ $P < 0,001^{**}$	$\rho = 0,071$ $P = 0,707$	$\rho = -0,40^*$ $P = 0,035^{**}$	1

\*Spearman's  $\rho$ : 0- 0,20 → çok zayıf korelasyon \*\* Anlamlı p değeri:  $p < 0,005$   
0,20-0,40 → zayıf korelasyon  
0,40-0,60 → orta derecede korelasyon  
0,60-0,80 → güçlü korelasyon  
0,80-1 → çok güçlü korelasyon



**Grafik 6.** Tüm Gruplardaki Parametrelerin Birbirleriyle Olan İlişkileri



## 5. TARTIŞMA

Reperfüze olan dokularda dolaşımın tekrar kurulması hasar geri dönüşümlü aşamada ise hücreleri nekroza gitmekten kurtarır, hasar geri dönüşümsüz aşamada ise reperfüzyonun kurtarıcı etkisi olmaz. Fakat iskeminin yoğunluk ve süresine bağlı olarak dolaşımın kurulmasından sonra değişen sayıda hücre nekroz ya da apoptozisle ölüme gider, bu durum reperfüzyon hasarını anlatır <sup>(100)</sup>. Reperfüzyon hasarı inflamatuvar kaskadın tüm basamaklarının rol oynadığı kompleks bir olaydır <sup>(101)</sup>. Bu kaskadın her bir basamağı için farmakolojik müdahale yöntemleri geliştirilmiştir <sup>(80)</sup>.

İ-R hasarı konusunda tıbbın çeşitli dallarınca birçok çalışma yapılmıştır. Plastik cerrahi ve replantasyon cerrahisinde bu konu oldukça önemli yer tutar. İskemi ve ardından gelişen reperfüzyon hasarının zararlı etkilerini ortadan kaldıracak veya azaltabilecek pek çok endojen ya da eksojen ajan tanımlanmıştır. Bunlar; serbest radikal temizleyiciler <sup>(37,40,102,103)</sup> (süperoksit dismutaz, katalaz, allopürinol, deferoksamin..vb), trombolitik ajanlar <sup>(104-108)</sup> (ürokinaz, doku plazminojen aktivatörü/TPA), PG-E<sub>1</sub> <sup>(109,110)</sup>, heparin <sup>(107)</sup>, vitamin C40, antiinflamatuvar ajanlar <sup>(107,109)</sup>, nitrik oksit (NO) donörleri <sup>(111)</sup>, eritropoetin <sup>(112)</sup>, hiperbarik oksijen <sup>(113)</sup>, kalsiyum kanal blokerleri <sup>(110,114,115)</sup>, aselüler fizyolojik yıkama solüsyonları <sup>(116)</sup>, immünsüpresifler<sup>(59)</sup> (FK- 506, siklosporin, deksametazon ), hormonlar <sup>(117,118)</sup> (dehidroepiandrosteron, progesteron), nötrofil adezyon ve fonksiyon reseptörlerinin antikorları <sup>(110,119,120,121)</sup> (CD11/18, ICAM-1, PECAM-1, E- selektin, P-selektin) ve büyüme faktörleri <sup>(122-127)</sup> (bFGF, PDGF, TGF, VEGF) olarak özetlenebilir.

Serbest radikal temizleyicilerinin sıçan ve insandaki enzim seviyelerinin farklı olması nedeniyle klinik kullanımları uygun değildir <sup>(40,41)</sup>. Trombolitik ajanlar, PG-E<sub>1</sub>, heparin, aspirin ve steroid klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Tüm bu ajanlar ek tedavi maliyeti, olası yan etki ve komplikasyonlar içermektedir. Bu nedenlerle çoğu, klinik uygulamada yaygınlaşmamıştır <sup>(5)</sup>.

Tosa ve arkadaşları <sup>(99)</sup>, yaptıkları çalışmada rat abdominal bölgesinden inferior epigastrik arter bazlı 4,5x3 cm'lik boyutlarda flep hazırlanmasını takiben flepte 9 saatlik iskemi sonrası %18-19 luk canlı kalan alan tespit etmişlerdir. Başka bir çalışmada bu oranlar, 7x4 cm'lik flepte 8 saatlik iskemide %65, 12 saatlik iskemide % 22 olarak tespit edilmiştir <sup>(74)</sup>. Bizim yaptığımız çalışmada 3x6 cm'lik flepte 9 saatlik iskemide flep canlılığı ortalama değeri 14,11±18,23 olarak bulunmuştur.

Çalışmamızda İ-R yapılmayan Sham grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu i-R hasarıyla uyumlu değişiklikler göstermiştir. Buna göre, kontrol grubunda sham grubuna kıyasla flep canlılığı azalmış, MDA, MPO ve nötrofil düzeyi artmış ve damar çapı genişliği azalmış olarak bulunmuştur.

Hem yetersiz perfüzyon hem de reperfüzyon hasarı sebebiyle dokularda ve damarlarda bir çok hücrel ve biyokimyasal değişiklikler oluşmaktadır. Bu değişikliklerin sonucunda flep nekrozunun gerçekleştiği kabul edilmektedir <sup>(4)</sup>. Reperfüzyon sürecinde hangi noktada hasarın geri dönüşümsüz olduğunu saptamaya yönelik yapılan çalışmalarda intravital mikroskopi ile kapiller damarlardan geçen kan akımı değerlendirilmiştir. Nekroz yüzdesi ile kapiller kan damarlarından geçen kan akımının doğrudan ilintili olduğu görülmüştür. İskemi sonrası reperfüzyonun ilk saatinde kapiller dolaşımında belirgin düşme olurken, 7.-8. saatlerde stabilize olduğu, 8-48 saat arası değişimin minimal olduğu ortaya konmuştur <sup>(128)</sup>. İ-R hasarı için olası mekanizmaları tetikleyen olayın, nötrofiller aracılığıyla oluşan venül hasarı ve reperfüzyon başlangıcındaki reaktif vazodilatasyon sonrası ilerleyici arteriolar vazokonstriksiyon olduğu gösterilmiştir <sup>(129)</sup>. Bu durumda iskemi reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik ana stratejinin nötrofiller aracılığıyla gerçekleşen inflamatuvar kaskadın baskılanması olduğunu varsayarak çalışmamızda, çeşitli dokularda (beyin, böbrek, barsak ve kas gibi) iskemi reperfüzyon hasarında olumlu etkileri gösterilmiş olan Diosmin + Hesperidinin rat abdominal epigastrik flep modelinde İ-R hasarına etkilerini incelemeye karar

verdik.Yaptığımız deneysel çalışma, bizim bilgilerimize göre rat abdominal epigastrik flep modelinde Diosmin + Hesperidinin İ-R hasarına etkisini araştıran ilk çalışmadır.

Bizim yaptığımız çalışmada nötrofil sayısı, tedavi gruplarında kontrol grubuyla kıyaslandığında anlamlı derecede azaldığı görüldü. Tedavi grupları kendi aralarında karşılaştırıldığında ise anlamlı fark bulunamadı. Tedavi gruplarında nötrofil sayısında azalma, Diosmin+Hesperidinin iskemi reperfüzyon hasarındaki olumlu etkilerini endotel stabilizasyonu sağlayarak, damar içinde dolaşan lökositlerin yuvarlanma ve yapışma özelliklerini bozmak suretiyle göstermesi şeklinde yorumlanabilir. İnflamasyonun ana hücreleri olan nötrofillerin sayısının azalması, inflamasyonun baskılanmasına neden olur, bunun sonucunda flep canlılığı artar. Flep canlılığındaki bu artış, nötrofil sayısındaki azalma ile ilişkilendirilebilir. Nitekim yaptığımız korelasyon analizinde flep canlılığı ve nötrofil sayısı arasında negatif yüksek korelasyon ( $\rho = -0,815, p < 0,001$ ) bulunmuştur.

Nolte ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada Diosmin+Hesperidinin iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu etkilerinin arteriol ve venüllerde endotelial bariyeri koruduğunu, makromoleküler sızıntıyı engellediğini bu etkiyi iskemi sonrası lökositlerin yuvarlanma ve yapışma özelliklerini bozarak sağladığını bildirmişlerdir <sup>(130)</sup>. Yapılan çeşitli deneysel çalışmalarda Diosmin+Hesperidinin postkapiller venüllerde endotel hücrelerine lökosit adhezyonunu azalttığı gösterilmiştir. <sup>(131-136)</sup>. Reperfüzyon hasarının oluşmasında postkapiller venüllerde endotel hücrelerine lökositlerin adhezyonu patogenezi başlatan ana olaydır <sup>(147)</sup>.Bizim yaptığımız çalışmada Diosmin + Hesperidinin kapiller seviyesindeki damar çaplarına etkisi olmadan perivasküler alanda nötrofil sayısını belirgin azalttığı gösterilmiştir. Buradaki muhtemel mekanizma, damar içinde serbest halde dolaşan lökositlerin adhezyonun engellenmesiyle damar dışına çıkan nötrofil sayısının azalması şeklinde yorumlanabilir.

Yaptığımız çalışmada, kontrol grubuyla kıyaslandığında T-1 ve T-2 gruplarında MPO düzeyleri azalmış, istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmasa da anlamlı sayılan p değerine çok yakın bir değer ( $p=0,077$ ) hesaplanmıştır. Bu durumda Diosmin+Hesperidinin inflamasyonu baskılamada hem nötrofillerin damar dışına çıkmasını engellediğini hem de nötrofil aktivitesini azalttığını söylemek mümkün olabilir.

Pickelmann ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada Diosmin+Hesperidinin iskemi reperfüzyon sonrası doku hasarını azalttığını bildirmişlerdir. Kantitatif olarak perivasküler alanda ölçülen lökosit sayısının anlamlı derecede azaldığını göstermişler aynı zamanda MPO seviyesinde hafif bir düşüş tespit etmişlerdir. İ-R sonrası doku hasarının azalmasını perivasküler alanda lökosit birikiminin engellenmesine bağlı olduğunu savunmuşlardır<sup>(135)</sup>. Benzer şekilde, bizim yaptığımız çalışmada da İ-R sonrası kontrol grubuna göre tedavi gruplarında, flep canlılığı artmış, nötrofil sayısı anlamlı derecede azalmış ve MPO düzeyinde anlamlı değere yakın azalma görülmüştür.

Nolte ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada iskemi reperfüzyon sonrası kontrol grubu ve Diosmin+Hesperidin tedavi grubunda MPO düzeyleri karşılaştırılmış. Diosmin+Hesperidin tedavi grubunda MPO düzeyleri azalmış olmasına rağmen istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamamıştır <sup>(130)</sup>. Bizim çalışmamızda da MPO düzeyleri azalmıştır. Bu azalma istatistiksel olarak anlamlı olmasa da anlamlı sayılan p değerine yakın bir değer (MPO p=0,077) bulunmuştur. MPO değeri, nötrofil akümülyasyonunun bir göstergesidir. MPO düzeylerindeki bu azalmanın sebebi diosmin +hesperidinin dokuda nötrofil sayısını azaltmasından mı yoksa membran stabilize edici özelliğinden mi kaynaklandığı konusu açık değildir.

Kılınç ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, rat ters akımlı ada fleplerinde Diosmin+Hesperidinin flep yaşamını artırdığı yönünde bulgular elde etmiş fakat Diosmin+Hesperidinin etki mekanizmasının tam anlamadığını bildirmişlerdir <sup>(138)</sup>.

E. Bouskela ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada intravital mikroskopide iskemi reperfüzyon öncesi ve sonrası arteriol ve venüllerin çapları karşılaştırılmıştır. Plasebo, kontrol ve Diosmin+Hesperidin tedavi grupları arasında karşılaştırma yapıldığında, plasebo grubunda damar çapları belirgin artmış fakat kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı fark bulunmadığını bildirmişlerdir <sup>(136)</sup>. Bizim yaptığımız çalışmada ise ışık mikroskopide kapiller seviyesinde damar çapları ölçülmüştür. Sonuçta sham grubunda damar çapları belirgin artmış, kontrol ve tedavi grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır. Gerek bizim yaptığımız çalışmada gerekse E. Bouskela ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Diosmin+Hesperidinin damar çapları üzerine hem arterioler, venüler hem de kapiller düzeyde etkisinin olduğu gösterilememiştir.

E.Bouskela ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada Diosmin+Hesperidinin kas iskemisi reperfüzyon hasarını azaltmada etkisinin doz bağımlı olduğu ortaya konmuştur<sup>(136)</sup>. Fátima ZGA Cyrino ve arkadaşlarının yaptığı deneysel çalışmada, hamster yanak poşu reperfüzyon hasar modelinde Diosmin+Hesperidinin doz bağımlı olarak makromoleküler geçirgenliği azalttığını, bu azalmanın 80mg/kg dozunda maximum düzeye ulaştığını bildirmişlerdir<sup>(137)</sup>. Bizim çalışmamızda farklı deneysel çalışmalar incelendikten sonra 30 mg/kg(T1 grubu) ve 80 mg/kg(T2 grubu) dozlarında Diosmin+Hesperidinin pre-op 10 gün ve post-op 7 gün süreyle uygulamaya karar verilmiştir. Tedavi grupları karşılaştırıldığında, T2 grubunda flep canlılık oranı T1 grubundan daha yüksek olmasına rağmen anlamlı fark bulunmamıştır. T2 grubunda nötrofil sayısı T1 grubundan daha düşük olmasına rağmen anlamlı fark bulunmamıştır. T2 grubunda MPO düzeyleri T1 grubundan daha düşük olmasına rağmen anlamlı fark bulunmamıştır. T1 ve T2 gruplarında damar çapları bakımından anlamlı fark bulunmamıştır. T2 grubunda MDA seviyesi T1 grubundan daha yüksek olmasına rağmen anlamlı fark bulunmamıştır. Sonuçta, Diosmin + Hesperidinin etkilerini göstermede 30 mg/kg ve 80 mg/kg dozlarında hafif düzeyde değişiklikler olsa da anlamlı fark yaratmadığı görülmüştür.

Yaptığımız deneysel çalışmada Diosmin +Hesperidinin İ-R hasarındaki olumlu etkilerini açıklamak için elimizdeki tüm parametrelerin (flepl canlılık oranları, damar çapları, nötrofil sayısı MDA ve MPO) beraber değerlendirilmesi ve yorumlanması daha uygun olacaktır. Buna göre, damar çapı en geniş olan sham grubunda flepl canlılık oranı en yüksektir. Yaptığımız Spearman's korelasyon analizinde tüm gruplar beraber değerlendirildiğinde flepl canlılığı ile damar çapı arasında orta derecede pozitif korelasyon ( $\rho = 0,587$ ,  $p < 0,001$ ) bulunmuştur. Kontrol grubu tedavi gruplarıyla kıyaslandığında kontrol grubunda damar çapı daha geniş olmasına rağmen flepl canlılık oranı tedavi gruplarından daha düşüktür. Bu durumda flepl canlılığının artışı ile ilişkilendirilmede damar çapı tek başına yeterli olmamaktadır. Damar çapları ve nötrofil sayıları flepl canlılığı ile ilişkilendirilmede beraber değerlendirildiğinde; flepl canlılığı en fazla olan grup sham grubudur. Çünkü hem damar çapı en geniş hem de dokuda inflamasyonun ana hücresi olan nötrofil sayısı en azdır. Buna göre kontrol grubu tedavi gruplarıyla kıyaslandığında, damar çapı tedavi gruplarından daha geniş olmasına rağmen nötrofil sayısı tedavi gruplarından daha fazla olduğu için flepl canlılık oranı

kontrol grubunda daha düşüktür. Nitekim yaptığımız Spearman's korelasyon analizinde flep canlılığı ile damar çapı arasında orta derecede pozitif korelasyon ( $\rho=0,587$ ,  $p<0,001$ ) ve flep canlılığı ile nötrofil sayısı arasında çok güçlü negatif korelasyon ( $\rho=-0,815$ ,  $p<0,001$ ) gösterilmiştir. Tedavi grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde T-2 grubunda damar çapı T1 grubundan daha dar olmasına rağmen nötrofil sayısı T-2 grubunda daha az olduğundan flep canlılık oranı T-2 grubunda daha yüksektir. Fakat hem damar çapı hem de nötrofil sayısı tedavi grupları arasında farklı değerlerde olsa da istatistiksel olarak anlamlı değildi. Bu durumda damar çapı, nötrofil sayısı ve nötrofil akümülyasyonunun bir göstergesi olan MPO değerlerinin beraber incelenmesi daha uygun olacaktır. Yaptığımız Spearman's korelasyon analizinde flep canlılığı ile MPO düzeyi arasında orta derecede negatif korelasyon ( $\rho=-0,40$ ,  $p=0,035$ ) bulunmuştur. Flep canlılık oranı en yüksek olan sham grubunda damar çapı en geniş, nötrofil sayısı en az ve MPO düzeyi en düşüktür. Buna göre kontrol grubu tedavi gruplarıyla kıyaslandığında damar çapı tedavi gruplarından daha geniş olmasına rağmen hem nötrofil sayısı daha fazla hem de MPO düzeyi en yüksek değerde olduğu için flep canlılık oranı kontrol grubunda daha düşüktür.

T-1 ve T-2 gruplarında kontrol grubuna göre canlılık artışı ile ilişkilendirilebilen bir diğer bulgu lipid yıkım ürünü olan MDA'daki azalmadır. Her ne kadar tedavi gruplarındaki azalma kontrol grubuyla kıyaslandığında istatistiksel olarak anlamlı bulunmasa da anlamlı p değerine yakın bir değer ( $p=0,067$ ) bulunmuştur.

MDA ve MPO düzeylerindeki artış, reperfüzyon hasarına bağlıdır. MDA seviyesindeki yükselme, artmış nekroz oranı yansıtırken, MPO seviyesindeki yükselme, artmış nötrofil birikimini ve aktivitesini yansıtmaktadır. <sup>(82)</sup>.

Umar ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada, Hesperidinin nötrofil aktivasyonu ve infiltrasyonunun, serbest radikal oluşumunu azaltarak kollajenle indüklenen artriti önlediği yönünde bulgular elde etmişlerdir<sup>(139)</sup>.

Pehlivan ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada, Diosmin+Hesperidinin intestinal iskemi reperfüzyon modelinde mukozal hasarı azalttığını bildirmişlerdir<sup>(140)</sup>.

Özetle, günümüze kadar yapılan çalışmalarda Diosmin+Hesperidinin antioksidan ve anti inflamatuvar (lökosit immoblizasyonu, komplaman inhbisyonu,

myeloperoksidasyonu azaltması, lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzim inhibisyonu, nitrik oksit seviyelerini düşürmesi gibi) birçok etkiye sahip olduğu bildirilmiştir. Yaptığımız çalışmada, Diosmin+Hesperidinin İ-R hasarında flep canlılığını arttırdığı, inflamasyonun ana hücreleri olan nötrofillerin birikimini azalttığı, aynı zamanda nötrofillerin fonksiyonunun bir göstergesi olan MPO değerinde anlamlıya yakın bir değerde azalma sağladığı görülmüştür. Diosmin +Hesperidinin İ-R hasarındaki olumlu etkilerini sadece nötrofil sayısını azaltarak mı yoksa hem nötrofil sayısını hem de MPO daki azalma sebebiyle nötrofillerin fonksiyonlarını da etkileyerek mi ortaya koyduğu konusu açık değildir. Altta yatan mekanizma henüz tam olarak aydınlatılamamış olsa da bütün bulgularımız Diosmin+Hesperidinin nötrofillerin dokuda birikimini engellemek suretiyle inflamasyonu erken basamaklarından itibaren baskılayarak flep canlılığını arttırdığı yönündeki hipotezimizi desteklemektedir. Diosmin + Hesperidinin İ-R sonrası doku hasarını azaltma ve flep canlılığını arttırmada altta yatan tüm mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır.

## 6. SONUÇLAR

- 1.Diosmin+Hesperidin İ-R hasarına bağlı flep nekrozunu azaltmıştır.
- 2.Diosmin+Hesperidin İ-R hasarına bağlı dokuda nötrofil birikimini azaltmıştır.
- 3.Diosmin+Hesperidin İ-R hasarına bağlı nötrofil akümülyasyonu ve aktivasyonun bir göstergesi olan MPO düzeylerini azaltmıştır. MPO düzeylerindeki bu azalma, anlamlı kabul edilen p değerine ( $p<0,05$ ) çok yakındır ( $p=0,077$ ).
- 4.Diosmin+Hesperidin İ-R hasarına bağlı artmış lipid peroksidasyon ürünü olan MDA düzeylerini azaltmıştır. MDA düzeylerindeki bu azalma, anlamlı kabul edilen p değerine ( $p<0,05$ ) çok yakındır( $p=0,067$ ).
- 5.Diosmin+Hesperidin İ-R hasarına bağlı damar çapları üzerine belirgin bir etkisi yoktur.
- 6.İ-R hasarının önlenmesinde, Diosmin+Hesperidinin inflamasyonun erken fazında dokuda nötrofil birikimini azalttığı yönünde kuvvetli bulgular elde ettik. Diosmin+Hesperidinin nötrofillerin dokuda birikimini engellemek suretiyle inflamasyonu erken basamaklarından itibaren baskılayarak flep canlılığını arttırdığı yönündeki hipotezi desteklemektedir. Diosmin + Hesperidinin İ-R sonrası doku hasarını azaltma ve flep canlılığını arttırmada altta yatan tüm mekanizmaları aydınlatmak için ileri çalışmalara ihtiyacı duyulmaktadır.
7. Bizim çalışmamızda Diosmin + Hesperidinin iki ayrı dozda(30mg/kg ve 80mg/kg) farklı etki yaratmadığı gösterilmiştir.



## KAYNAKLAR

1. Place M.J., Herber S.C., Haerdesty R.A. Basic techniques and principles in plastic surgery. Grabb & Smith's Plastic Surgery. 5th edition. Philadelphia:Lippincott-Raven Publishers. 1997;13-25.
2. Geddes C.R., Morris S.F., Neligan P.C. ve ark: Perforator flaps: evolution, classification, and applications. *Ann Plast Surg*, 2003, Jan;50(1):90-99.
3. Taylor G.I., Minabe T. The angiosomes of the mammals and other vertebrates. *Plast Reconstr Surg*, 1992, 89:181-215.
4. Zhang F., Waller W., Lineaweaver W.C. Growth factor and flap survival. *Microsurgery*, 2004, Apr;162-167,.
5. Vedder N.B. Flap physiology. *Mathes Plastic Surgery*, 2nd edition Philadelphia: Saunders Elsevier Inc, 2006, vol:1;483-506,.
6. Blaisdell F.W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 2002, Dec;10(6):620-30.
7. Bobek V., Sramek D., Rokyta R. Local pharmacological preconditioning increases the survival of experimental skin flaps in rats. *Life Sci*, 2005,77:2663-68.
8. Kerrigan C.L. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg*, 1983, Dec;72(6):766-777.
9. Zimmerman B.J., Granger DN. Reperfusion injury. *Surg Clin North Am* 1992; 72: 65-83.
10. Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. *Acta Univ Carol Med Monogr* 1990; 137:1-53.
11. Jennings R.B., Reimer K.A. The cell biology of acute myocardial ischemia. *Annu Rev Med* 1991; 42: 225-246.
12. Green C.J., Gower J.D., Healing G., Cotterill L.A., Fuller B.J., Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: an overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. *Free Radic Res Commun* 1989;7: 255-64.

13. Orrenius S., Burkitt MJ., Kass GE, Dypbukt JM., Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol* 1992; 32 Suppl: S33-42.
14. Parks DA., Williams TK., Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988 May;254 (5 Pt 1):G768-74.
15. Homer-Vanniasinkam S., Crinnion JN., Gough MJ. Post-ischaemic organ dysfunction: a review. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;14: 195-203.
16. Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. *FASEB J*, 1995; 9: 526-533.
17. Davies SJ., Reichardt-Pascal SY., Vaughan D., Russel GI. Differential effect of ischemia-reperfusion injury on anti-oxidant enzyme activity in the rat kidney. *Exp Nephrol* 1995; 3: 348-354.
18. Reiter RJ., Acuña-Castroviejo D., Tan DX., Burkhardt S. Free radicalmediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci* 2001; 939: 200-215.
19. Frangogiannis NG. Chemokines in ischemia and reperfusion. *Thromb Haemost.* 2007; 97: 738-747.
20. Woodfin A., Voisin MB., Nourshargh S. PECAM-1: a multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2007; 27: 2514-2523.
21. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 2004; 61: 481-497.
22. Schoenberg MH., Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 1993; 21: 1376-1386.
23. Chatterjee PK. Novel pharmacological approaches to the treatment of renal ischemia-reperfusion injury: a comprehensive review. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 2007;376): 1-43.
24. Korthuis RJ., Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993; 16(4 Suppl 1): I19-26.

25. Suzuki M., Asako H, Kubes P., Jennings S., Grisham MB., Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res* 1991; 42: 125-138.
26. García-Villalón AL., Amezquita YM., Monge L., Fernández N., Salcedo A., Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia-reperfusion. *Vascul Pharmacol.* 2008; 48:109-114.
27. Phillips L., Toledo AH., Lopez-Neblina F., Anaya-Prado R., Toledo- Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg* 2009; 22:46-55
28. Burnstock G., Ralevic V.: New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. *Br J Plast Surg*, 1994, 47:527-543.
29. Daniel R.K., Kerrigan C.L. Principle and physiology of skin flap surgery. In McCarthy J.G., ed: *Plastic Surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1990,275-328.
30. Vedder NB. Flap Physiology. In: Mathes SJ, Hentz VR (eds), *Plastic Surgery*, Volume I. WB Saunders Company, Philadelphia 2006; pp:483-506.
31. Kerrigan C.L., Daniel R.K.:Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg*, 1983,71:519-524.
32. Kerrigan C.L., Daniel R.K.: Skin flap research: A candid view. *Ann Plast Surg*, 1984,13:383- 387.
33. Hjordal V.E., Sinclair T., Kerrigan C.L. ve ark.: Arterial ischemia in skin flaps: Microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg*, 1994, 93:378-385.
34. Blaisdell F.W.: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome:a review. *Cardiovasc Surg*, 2002,Dec;10(6):620-30.
35. Im M.J., Su C.T., Anthenelli R.M. Skin-flap metabolism in rats: Oxygen consumption and lactate production. *Plast Reconstr Surg*, 1983, 71:685-688.
36. Angel M.F., Ramasastry S.S., Swartz W.M. ve ark. Free radicals:basic concept concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 1987,79:990-997.

37. Manson P.N., Anthenelli R.M., Im M.J., Bulkley G.B., Hoopes J.E.: The Role of oxygenfree radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg*, 1983, Jul;198(1):87-90.
38. Calhoun KH., Tan L., Seikaly H. An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-refleow. *Laryngoscope*, 1999, Apr;109(4):528-35.
39. Pang C.Y. Ischemia-induced reperfusion injury in muscle flaps: pathogenesis and major source of free radicals. *J Reconstr Microsurg*, 1990, Jan;6(1):77-83.
40. Angel M.F., Ramasastry S.S., Swartz W.M. ve ark. Augmentation of skin flap with allopurinol. *Ann Plast Surg*, 1987, 18:494-498.
41. Green C.J., Dhami L., Prasad S., Healing G., Shurey C.: The effect of desferrioxamine on lipid peroxidation and survival of ischemic island skin flaps in rats. *Br J Plast Surg*, 1989, 42:565- 569.
42. Wilkins E.G., Rees R.S., Cashmer B. ve ark. Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue. *Ann Plast Surg*, 1993, Jul;31(1):60-5.
43. Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117:1024-33.
44. Brown DL, Borschel GH. *Michigan Manuel of Plastic Surgery*. Philadelphia, Baltimore, New York, London, Buenos Aires, Hong Kong, Sydney, Tokyo, 2004, Lippincott Williams & Wilkins, pp: 41.
45. Mowlavi, A., Neumeister, M. W., Wilhelmi, B., et al. Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast. Reconstr. Surg*. 2003;111:242-50.
46. Rosen, H. M., Slivjak, M. J., and McBrearty, F. X., The role of perfusion washout in limb revascularization procedures. *Plast. Reconstr. Surg*. 1987; 80:595-605.
47. Wagh, M., Pantazi, G., Romeo, R., et al. Cold storage of rat skeletal muscle free flaps and pre-ischemic perfusion with modified UW solution. *Microsurgery*. 2000;20:343-9.

48. Shah, D. K., Zhang, W. X., Forman, D., et al. Combination therapy for salvaging a failing, experimental skin flap. *J. Reconstr. Microsurg.* 1996;12: 365-9.
49. Wechselberger, G., Schoeller, T., Ohler, K., et al. Flap salvage in a “flowthrough” flap by manual thrombectomy plus thrombolytic therapy. *J. Reconstr. Microsurg.* 1998;14:127-9.
50. Schubert, W., Hunter D. W., Guzman-Stein, G., et al. Use of streptokinase for the salvage of a free flap: Case report and review of the use of thrombolytic therapy. *Microsurgery* 1987;8:117-21.
51. Hataya, Y., Matsuo, K., Ishigaki, M., et al. Retrograde intraarterial infusion of prostaglandin E1 and heparin for the no-reflow phenomenon after oromandibular reconstruction with a free fibular flap. *Ann. Plast. Surg.* 1999; 42:92-5.
52. Morris S.F., Taylor I. Predicting the survival of experimental skin flap with a knowledge of the vascular architecture. *Plast Reconstr Surg*, 1993,Dec;92(7):1352-1361.
53. Myers M.B. Attempts to augment survival in skin flaps: Mechanism of the delay phenomenon. In Grabb C.,Myers M.B. *Skin Flaps*. Boston:Little Brown, 1975, 65-79.
54. Callegari P.R., Taylor I., Caddy C.M., Minabe T.: An anatomic review of the delay phenomenon: i. experimental studies. *Plast Reconstr Surg*, 1992,March;89(3):397-407.
55. Restifo R.,J.,Ward B.A. Scoutt L.M. ve ark:Timing, magnitude, and utility of surgical delay in the TRAM flap: II.Clinical studies. *Plast Reconstr Surg*, 1997,Apr;99(5):1217-1223.
56. Taylor G.I., Corlett R.J., Caddy C.M. ve ark: An anatomic review of the delay phenomenon. II. Clinical applications. *Plast Reconstr Surg*, 1992, Marc;89(3):408-418.
57. Adanalı G., Özer K., Siemonow M.: Early and late effects of ischemic preconditioning on microcirculation of skeletal muscle flaps. *Plast Reconstr Surg*, 2002, April;109(4):1344-52.

58. Baumeister S., Ofer N., Kleist C. ve ark: Reduction of skeletal muscle injury in composite tissue allotransplantation by heat stress preconditioning. *Plast Reconstr Surg*, 2004,Dec;114(7):1832-1840.
59. Hoşnüter M., Babuççu O., Kargı E., Altinyazar C.: Dual preconditioning: effects of pharmacological plus ischemic preconditioning on skin flap survival. *Ann Plast Surg*, 2003, Apr;50(4):398-402.
60. Küntscher M.V., Kastel T., Sauerbier M. ve ark.: Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery*, 22(6):221-226, 2002.
61. Maldonado C.,Stadelmann W.K.,Ramirez S. ve ark: Preconditioning of latissimus dorsi muscle flaps with monophosphoryl lipid A. *Plast Reconstr Surg*, 2003,Jan;111(1):267-274.
62. Murry C.E., Jennings R.B., Reimer K.A.: Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*, 1986, 74:1124-1136.
63. Rees R., Punch J., Shaheen K. ve ark.: The stress response in skin:the role of neutrophil products in preconditioning. *Plast Reconstr Surg*, 1993, 92:110-117.
64. Addison P., Neligan P., Forrest C., Pang C.Y. ve ark: Acute adenosine treatment is effective in augmentation of ischemic tolerance in muscle flaps in the pig: an update. *Plast Reconstr Surg*, 2003,Feb;111(2):842-45.
65. Pang C.Y., Yang R., Zhong A. ve ark. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res*, 1995, 29:782-788.
66. Woitaske M.D., McCarter Roger M.S.: Effect of fiber type on ischemia-reperfusion injury in mouse skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*, 1998, Nov;102(6):2052-2063.
67. Gurke L., Marx A., Sutter P.M. ve ark.: Ischemic preconditioning improves post-ischemic skeletal muscle function. *Am Surg*, 1996, May;62(5):391-4.
68. Forrest C.R., Neligan P., Pang C.Y. ve ark. Acute adenosine treatment is effective in augmentation of ischemic tolerance in muscle flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg*, 1997,Jan;99(1):172-182.

69. Hopper R.A., Forrest C.R., Xu H. ve ark. Role and mechanism of PKC in ischemic preconditioning of pig skeletal muscle against infarction. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2000,279:R666-676.
70. Küntscher M.V., Kastel T., Altmann J. ve ark.: Acute remote ischemic preconditioning II: The Role of Nitric Oxide. *Microsurgery*, 2002,22(6):227-231.
71. Küntscher M.V., Kastel T., Sauerbier M. ve ark.: Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. *Microsurgery*, 2002,22(6):221-226.
72. Küntscher M.V., Schirmbeck E.U., Menke H. ve ark.: Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. *Plast Reconstr Surg*, 2002,109(7):2398- 2404.
73. Baumeister S., Ofer N., Kleist C. ve ark: Reduction of skeletal muscle injury in composite tissue allotransplantation by heat stres preconditioning. *Plast Reconstr Surg*, 2004,Dec;114(7);1832-1840.
74. Kuo, Y. R., Jeng S. F., Wang, F. S., Huang, H. C., Wei, F. C., and Yang, K. D. Platelet glycoprotein b/a receptor antagonist ( abciximab) inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia/reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 2002;107:50-5.
75. Carrol WR, Esclamado RM. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck.* 2000 Oct;22(7):700-13. Review.
76. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 2004;24(6):468-75. Review.
77. Kuo, Y. R., Wang, F. S., Jeng S. F., Huang, H. C., Wei, F. C., Yang, K. D. Nitrosoglutathione Modulation of Platelet Activation and Nitric Oxide Synthase Expression in Promotion of Flap Survival after Ischemia/ Reperfusion Injury. *J Surg Res.* 2004 Jun 1;119(1):92-9.tissue transfers. *Microsurgery.* 2004;24(6):468-75. Review.
78. Panes J, Perry M, Granger DN: Leukocyte endotelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol* 1999;126:537-50

79. Chiang N, Gronert K, Clish CB, O'Brien JA, Freeman MW, Serhan CN: Leukotriene B4 receptor transgenic mice reveal novel protective roles for lipoxins and aspirin-triggered lipoxins in reperfusion. *J Clin Invest* 1999;104:309-16.
80. Collard CD.,Gelman S. Pathophysiology, Clinical Manifestations, and Prevention of Ischemia-Reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001;94:1133-8.
81. Vedder NB. Flap Physiology. In: Mathes SJ, Hentz VR (eds), *Plastic Surgery, Volume I*. WB Saunders Company, Philadelphia 2006; pp:483-506.
82. Cetinkale O, Bilgiç L, Bolayirli M, et al: Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1998;102:153-160.
83. Arumugam TV, Magnus T, Woodruff TM, Proctor LM, Shiels IA, Taylor SM. Complement mediators in ischemia-reperfusion injury. *Clin Chim Acta*. 2006 Dec;374(1-2):33-45. Epub 2006 Jun 14. Review.
84. Collard CD, Lekowsky R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL: Complement activation following oxidative stress. *Mol immunol* 1999;36:941-8.
85. Vakeva AP, Agah A, Rollins SA, Matis LA, Li L, Stahl GL: Myocardial infarction and apoptosis after myocardial ischemia and reperfusion: Role of the terminal complement components and inhibition by anti-C5 therapy. *Circulation* 1998; 97:2259-67
86. Land, W., Schneeberger, H., Schleichner, S., et al. The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants. *Transplantation*.1994;57: 211-7.
87. Prada, F. S., Arrunategui, G., Alves, M., et al. Effect of allopurinol, superoxide-dismutase, and hyperbaric oxygen on flap survival. *Microsurgery* 2002; 22: 352-60.
88. Bilgin-Karabulut, A., Ademoglu, E., Aydin, I., et al. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J. Reconstr. Micrusurg*. 2001;17:425-9.



89. Bozkurt, A. K. Alpha-tocopherol (vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J. Cardiovasc. Surg. (Torino)* 2002;43:693-6.
90. Johnston AM, Paul HJ, Young CG. Effects of micronization on digestive absorption of diosmin. *Phlebology* 1994; 6 (Suppl. 1): 4–6.
91. Garner RC, Garner JV, Gregory S, Whattam M, Calam A, Leong D. Comparison of the absorption of micronized (Daflon®500 mg) and nonmicronized <sup>14</sup>C-diosmin tablets after oral administration to healthy volunteers by accelerator mass spectrometry and liquid scintillation counting. *J. Pharm. Sci.* 2002; 91: 32–40.
92. Duchene MP, Amiel M, Barbe R. Evaluation of the clinical pharmacological activity of a phlebotonic agent. Application to the study of Daflon 500 mg. *Int Angiol* 1988; 7(2): 25-32.
93. Heusser J; Osswald W. Toxicological properties of diosmin and its actions on the isolated venous tissue of the dog. *Arch. de Pharmacol. y Toxicol.* 1977; 111(1): 33-40.
94. Melzig MF, Loose R. Inhibition of LPS-induced endothelial cytotoxicity by diosmin. *Pharmazie* 1999; 54(4): 298-299.
95. Korthuis RJ, Gute DG. Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: Activity of a micronized purified flavonoid fraction. *J Vasc Res* 1999; 36(1): 15-23.
96. Santus R et al. Daflon as a cellular antioxidant and a membrane-stabilizing agent in human fibroblasts irradiated by UV A radiation. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 1991; 8(5): 200-205.
97. Labrid C. A lymphatic function of Daflon 500 mg. *Int Angiol* 1995; 14(3-1): 36-38.
98. Oustrin J, Fauran MJ, Commanay L. A pharmacokinetic study of <sup>3</sup>Hdiosmin *Arzneimittelforschung* 1977; 27(9): 1688-1691.

99. Tosa, Y., Andrew Lee, W. P., Kollias, N., Casanova, R., Randolph, M. A., and May, J. W. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 protects rat skin flap against ischemia-reperfusion injury. In K. Harii (Ed.), *Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery: Transactions of the 11th Congress of the international Confederation*. Amsterdam: Kugler, 1995.
100. Atiyeh B.S., Fuleihan N.S., Musharafieh R.S.: Pharmacological partial salvage of a failing flap with recombinant tissue plasminogen activator (rt-PA). *J Reconstr Microsurg*, 1999 Nov;15(8):585-90.
101. Olivas T.P., Saylor T. F., Zamboni W. A.: Timing of microcirculatory injury from ischemia reperfusion. *Plast Reconstr Surg*, 2001;107(3):785-788.
102. : 1984-1994: Ten years of skin flaps.Recent advances in experimental surgery. *Ann Chir Plast Esthet*, 1995Oct;40(5):583-95.
103. Hashimoto I., Nakanishi H., Shono Y. ve ark.: The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1. *Plast Reconstr Surg*, 2003 Jun;111(7):2307-2313.
104. Maeda M.,Fukui A.,Tamai S.: Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps. *J Reconstr Microsurg*, 1991;7:233-243.
105. Frick A., Baumeister R.G.H., Vollmar B. ve ark: Secondary ischaemia in experimental free flaps-treatment by long acting prostacyclin analogues. *Br J Plast Surg*, 1999: 52:392-398.
106. Hong J.P., Chung Y.K.,Chung S.H.: The effect of prostoglandin E1 versus ischemiareperfusion injury of musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg*, 2001 Sept;47(3):316-321.
107. Hashimoto I., Nakanishi H., Shono Y. ve ark.: The features of thrombus in a microvessel injury model and the antithrombotic efficacy of heparin, urokinase, and prostaglandin E1. *Plast Reconstr Surg*, 2003 Jun;111(7):2307-2313.
108. Maeda M.,Fukui A.,Tamai S.: Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps. *J Reconstr Microsurg*, 1991;7:233-243.

109. Frick A., Baumeister R.G.H., Vollmar B. ve ark: Secondary ischaemia in experimental free flaps-treatment by long acting prostacyclin analogues. *Br J Plast Surg*, 1999; 52:392-398.
110. Hong J.P., Chung Y.K., Chung S.H.: The effect of prostoglandin E1 versus ischemiareperfusion injury of musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg*, 2001 Sept;47(3):316-321.
111. Lille S., Boyle E.M., Schoeller T. ve ark: Augmentation of cAMP improves muscle-flap survival and tissue inflammation in response to ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg y*, 1999 Jan;15(1):37-45.
112. Saray A., Özakpınar R., Koç C. ve ark: Effects of chronic and short –term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope*, 2003 Jan;113:85- 89.
113. Hong J.P., Kwon H., Chung Y.K. ve ark: The effect of hyperbaric oxygen on ischemiareperfusion injury. *Ann Plast Surg*, 2003 Nov;51(5):478-487.
114. Galich S.P., Druik N.F., Stechenko L.A. ve ark.: Experimental studying of the possible pharmacological defense of muscular flap tissues from ischemic and reperfusion injury during its free transplantation. *Klin Khir*, 1999 (1):35-8.
115. Kara I.G., Kara C.O., Özden A. ve ark.: The Effect of trimetazidine on the survival of rat island skin flaps subjected to ischemia-reperfusion injury. *Ann Plast Surg*, 2001 Aug;47(2):168- 171.
116. Calhoun KH., Tan L., Seikaly H.: An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-refleow. *Laryngoscope*, 1999 Apr;109(4):528-35.
117. Asim K., Ashrafpour H., Huang N. ve ark: Acute local subcutaneous VEGF165 injection for augmentation of skin flap viability:efficacy and mechanism. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2004 Nov;287;219-229.
118. Uysal O.A.: The effect of progesteron hormone on the viability of flaps. *Eur J Plast Surg*, 1991, 14:192-196.

119. Khiabani K.T., Stephenson L., Zamboni W.A. ve ark.: A quantitative method for determining polarization of neutrophil adhesion molecules associated with ischemia reperfusion. *Plast Reconst Surg*, 2004 Dec;114(7):1846-1850.
120. Türegün M., Newman P., Siemionov M. ve ark.: Blockade of platelet endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) protects against ischemia-reperfusion injury in muscle flaps at microcirculatory level. *Plast Reconstr Surg*, 1999 Sep;104(4):1033-1040.
121. Vedder N.B.: Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule 1 protects skin flaps against ischemia-reperfusion injury: an experimental study in rats. *Plast Reconstr Surg*, 1998 May;101(6):1595,1596.
122. Lineaweaver W.C., Lei M.P., Mustain W. ve ark.: Vascular endothelium growth factor, surgical delay, and skin flap survival. *Ann Surg*, 2004 June;239(6):866-875, 2004.
123. Machens H.G., Morgan J.R., Bertiaume F. ve ark.: Platelet-derived growth factor-AA mediated functional angiogenesis in the rat epigastric island flap after genetic modification of fibroblasts is ischemic dependent. *Surg*, 2002 Apr;131:393-400.
124. Machens H.G., Salehi J., Weich H. ve ark.: Angiogenic effects of injected VEGF165 and SVEGFR-1 (sFLT-1) in a rat flap model. *J Surg Res*, 2003 111:136-142.
125. Neumeister m.W., Song Y.H., Mowlavi A. ve ark.: Effects of liposome mediated gene transfer of vegf in ischemic rat gracilis muscle. *Microsurgery* 2001,21:58-62,
126. Seify H., Bilkay U., Jones G.: Improvement of TRAM flap viability using human VEGF-induced angiogenesis: a comparative study of delay techniques. *Plast Reconstr Surg*, 2003 Sep;112(4):1032-1039.
127. Wong M.S., Erdman D., Sweis R. ve ark.: Basic fibroblast growth factor expression following surgical delay of rat transverse rectus abdominis myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg*, 20
128. Suzuki S., Matsushita Y., Isshiki N. ve ark.: Salvage of distal flap necrosis by topical superoxide dismutase. *Ann Plast Surg*, 1991 Sep;27(3):253-7.04 June;113(7):2030-2036.

129. Akan M., Çakır B., Aköz T. ve ark.: Effects of clopidogrel and high dose aspirine on survival of skin flaps in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surgery*, 2005, 39:7-10.
130. Nolte D, Pickelmann S, Mollman M et al. Effects of the phlebotropic drug Daflon 500 mg on postischemic microvascular disturbances in striated skin muscle: An intravital microscopic study in the hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 1999; 139: 526–35
131. Bouskela E, Cyrino FZGA, Lerond L. Leukocyte adhesion after oxidant challenge in the hamster cheek pouch microcirculation. *J. Vasc. Res.* 1999; 36 (Suppl. 1): 11–14.
132. Bouskela E, Donyo KA, Verbeuren TJ. Effects of Daflon 500 mg on increased microvascular permeability in normal hamsters. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1995; 15 (Suppl. 1): 22–6.
133. Friesenecker B, Tsai A., Allegra C., Intaglietta M., Oral administration of purified micronized flavonoid fraction suppresses leukocyte adhesion in ischemia/reperfusion injury: In vivo observations in the hamster skinfold. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1994; 14: 50–5.
134. Hultström D, Svensjö E. Intravital and electron microscopic study of bradykinin-induced vascular permeability changes using FITC-dextran as a tracer. *J. Pathol.* 1979; 129: 125 (Abstract).
135. Pickelmann rug Daflon 500 mg on postischemic reperfusion injury in striated skin muscle: A histomorphology. Nolte D, Leiderer R, Mollmann M, Schultze E, Meßmer K. Effects of the phlebotropic drug on postischemic reperfusion injury in striated skin muscle: A histomorphology study in the hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 1999; 134: 536–45
136. E. Bouskela, F.Z.G.A. Cyrino & \*L. Lerond. Effects of oral administration of different doses of purified micronized flavonoid fraction on microvascular reactivity after ischaemia/reperfusion in the hamster cheek pouch. *British Journal of Pharmacology* (1997) 122, 1611 -16
137. Fátima ZGA Cyrino, Daniel A Bottino, Laurence Lerond and Eliete Bouskela. Micronization Enhances The Protective Effect Of Purified Flavonoid Fraction Against Postischaemic Microvascular Injury In The Hamster Cheek Pouch. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology* (2004) 31, 159–162

138. Kilinc, Hidir MD; Aslan, Suleyman Serkan MD; Bilen, Bilge Turk MD; Eren, Ahmet Tuna MD; Karadag, Nese MD; Karabulut, Aysun Bay MD. Effects of Verapamil, Nifedipine, and Daflon on the Viability of Reverse-Flow Island Flaps in Rats. *Annals of Plastic Surgery*: November 2013 - Volume 71 - Issue 5 - p 610–614
139. Umar S., Kumar A., Sajad M., Zargan J., Ansari M., Ahmad S., Katiyar CK., Khan HA. Hesperidin inhibits collagen-induced arthritis possibly through suppression of free radical load and reduction in neutrophil activation and infiltration. *Rheumatol Int.* 2013 Mar;33(3):657-63.
140. Pehivan M., Hazinedaroğlu SM., Kayaoglu HA., Erkek AB., Keklik T., Canbolat O., Kocak S. The effect of diosmin hesperidin on intestinal ischaemia--reperfusion injury. *Acta Chir Belg* 2004 Nov-Dec;104(6):715-8.
141. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In: Colowick SP, Kaplan NO (eds), *Methods Enzymol* Volume 105. Academic Press, Inc. New York, San Francisco, London 1984: 328–31.
142. Ohkawa W, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 1979; 95: 351–58.
143. Bradford MM. A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248–254.

T.C.

ERCIYES ÜNİVERSİTESİ

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞI'NA

**Dr. Selçuk YAZAN'a ait''Rat Abdominal Epigastrik Flebinde Diosmin+ Hesperidinin İskemi Reperfüzyon Hasarına Etkisi''** adlı çalışma jürimiz tarafından **Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi** Anabilimdalı Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tarih:.../.../2015

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi  
Anabilim Dalı Öğr.Üye.  
Prof. Dr. Galip Kemal GÜNAY

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi  
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi  
Anabilim Dalı Öğr.Üye.  
Prof. Dr. İrfan ÖZYAZGAN

Adıyaman Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı Öğr.Üye

Yrd.Doç.Dr.Fatih DOĞAN