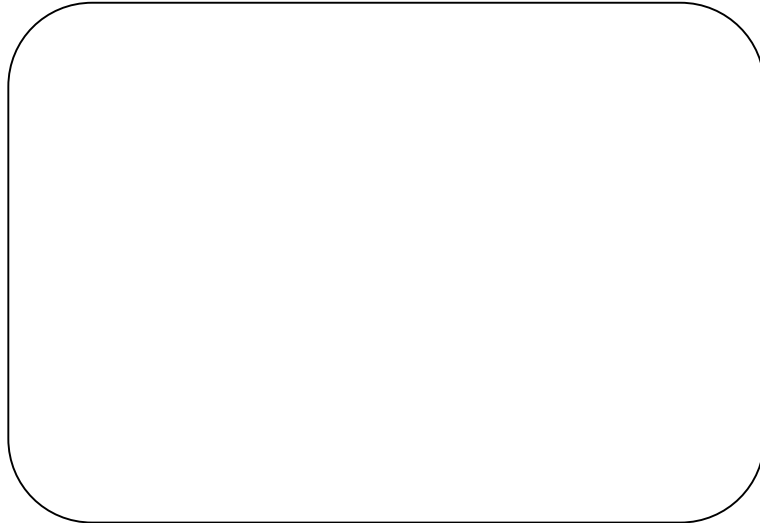




**T.C.**  
**AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ**  
**TIP FAKÜLTESİ**



**RATLARDA ARKA BACAK MODELİNDE PYCNOGENOL'UN  
İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI ÖNLEMEDEKİ ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ**  
Arş. Grv. Dr. Şükrü İŞLER

**DANIŞMAN**  
Doç. Dr. Yavuz DEMİR

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ**  
**ANABİLİMDALI**

**AFYONKARAHİSAR 2013**

**Bu tez Çalışması BAPK'ca Desteklenmiştir. Proje No "11.TUS.12"**

**T.C.  
AFYON KOCATEPE ÜNİVERSİTESİ  
TIP FAKÜLTESİ**

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI**

**RATLARDA ARKA BACAK MODELİNDE  
PYCNOGENOL'UN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINI  
ÖNLEMEDEKİ ETKİSİ**

**TIPTA UZMANLIK TEZİ  
DR. ŞÜKRÜ İŞLER**

**DANIŞMAN  
DOÇ. DR. YAVUZ DEMİR**

**AFYONKARAHİSAR 2013**

**Bu tez Çalışması BAPK'ca Desteklenmiştir. Proje No "11.TUS.12"**

İş bu çalışma jürimiz tarafından PLASTİK, REKONSTRÜKTİF  
VE ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI' nda TIPTA  
UZMANLIK TEZİ olarak kabul edilmiştir.

BAŞKAN

ÜYE

ÜYE

ONAY

DEKAN

## TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimimde ve tez çalıŐmalarımnda bilgi ve tecrubesinden yararlandığım, mesleğimi icra etmemde büyük emekleri olan Anabilim Dalı BaŐkanımız ve tez danıŐmanım Sayın Doç. Dr. Yavuz Demir'e teşekkür ederim.

Mesleki bilgi ve tecrübelerini aktaran, emeğini ve hoŐgörüsünü esirgemeyen Sayın Doç. Dr. Nurten Turhan Haktanır'a teşekkür ederim.

Tez alıŐmalarımdaki katkılarından dolayı Tıbbi Biyokimya Anabilim Dalı ğretim yesi Sayın Prof. Dr. Tülay KÖKEN'e, Biyoistatistik Anabilim Dalı ğretim yesi Sayın Doç. Dr. Nurhan Doğan'a teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince birlikte çalıŐtıđım asistan arkadaŐlarım ve deney aşamasında zamanını esirgemeyen ekip arkadaŐlarım teşekkür ederim.

Tüm ğrenim hayatım boyunca desteğini ve sevgisini eksik etmeyen eŐim ve aileme teşekkür ederim.

Dr. Şükrü İŞLER

# İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEŞEKKÜR	I
İÇİNDEKİLER	II-III
KISALTMALAR	IV
TABLolar ÇİZELGESİ	V
ŞEKİLLER ÇİZELGESİ	VI-VII
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
2.1. FLEP TANIMI VE TARİHÇESİ	2
2.2. FLEP SINIFLANDIRMASI	3
2.2.1. DOKU İÇERİĞİNE GÖRE FLEPLER	3
2.2.2. AKTARIM ŞEKLİNE VE YERİNE GÖRE FLEPLER	3
2.2.3. KANLANMA KAYNAĞINA GÖRE FLEPLER	4
2.3. FLEP FİZYOLOJİSİ	5
2.3.1. DERİNİN KANLANMASI	5
2.3.2. FLEP KAN AKIMININ REGÜLASYONU	8
2.3.3. FLEPLERDE NEOVASKÜLARİZASYON PATOGENEZİSİ	11
2.3.4. FLEP KAYBI NEDENLERİ	13
2.4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI	15
2.4.1. İSKEMİ	15
2.4.2. REPERFÜZYON VE REPERFÜZYON HASARI	16
2.4.3. SERBEST RADİKALLER VE REPERFÜZYON HASARINDAKİ ROLLERİ	20
2.4.4. ANTİOKSİDAN SAVUNMA SİSTEMLERİ	23
2.5. PYCNOGENOL	24

	Sayfa
III. GEREÇ VE YÖNTEM	30
3.1. KULLANILAN DENEKLER VE BAKIMI	30
3.2. DENEY PROTOKOLU	30
3.2.1.ÇALIŞMA GRUPLARI	30
3.2.2. DENEY AŞAMASININ SONLANDIRILMASI	38
3.3. DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ	38
3.3.1 BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME	38
3.3.2. İSTATİSTİKSEL DEĞERLENDİRME	39
IV. BULGULAR	40
4.1. MAKROSKOBİK BULGULAR	40
4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR	40
V. TARTIŞMA	52
VI. SONUÇ	59
VII. ÖZET	60
VIII. SUMMARY	61
IX. KAYNAKLAR	62

## KISALTMALAR

ATP:	Adenozin Trifosfat
CAT:	Katalaz
GSH:	Glutasyon
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> :	Hidrojen Peroksit Radikali
IL:	İnterlökin
ICAM 1:	İntersellüler Adezyon Molekülü
LOO-:	Lipid Peroksi Radikali
LB <sub>4</sub> :	Lökotrien B <sub>4</sub>
MDA:	Malondialdehit
MPO:	Myeloperoksidaz
NGF:	Sinir Büyüme Faktörü
NO:	Nitrik Oksit
O <sub>2</sub> <sup>-</sup> :	Süperoksit Radikali
OH <sup>-</sup> :	Hidroksil Radikali
PAF:	Trombosit Aktive Edici Faktör
PGI <sub>2</sub> :	Prostasiklin
PYC:	Pycnegenol
SOR:	Serbest Oksijen Radikalleri
TNF-a:	Tümör Nekrozis Faktör- alfa
TXA <sub>2</sub> :	Tromboxan A <sub>2</sub>
VCAM 1:	Vasküler Hücre Adezyon Molekülü



## TABLÖLAR ÇİZELGESİ

	<u>Sayfa</u>
<b>Tablo I:</b> Flep Kan Akımının Düzenlenmesi	10
<b>Tablo II:</b> Doku ve serum MPO düzeyleri	40
<b>Tablo III:</b> Doku ve serumde MDA düzeyleri	42
<b>Tablo IV:</b> Doku ve serum GSH düzeyleri	44
<b>Tablo V:</b> Doku ve serum IL2 düzeyleri	47
<b>Tablo VI:</b> Doku ve serum IL10 düzeyleri	48
<b>Tablo VII:</b> Doku ve serum TNF düzeyleri	51

## ŞEKİLLER ÇİZELGESİ

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 1:</b> Deri fleplerinin vasküler anatomiye göre sınıflaması	5
<b>Şekil 2:</b> Fasyokutanöz fleplerin Cormack-Lamberty Sınıflaması	6
<b>Şekil 3:</b> Fasyokutanöz fleplerin Mathes-Nahai Sınıflaması	7
<b>Şekil 4:</b> A: Choke anastomozlar, B: Gerçek anastomozlar	8
<b>Şekil 5:</b> Perfüzyon bölgeleri	13
<b>Şekil 6:</b> İskemi – reperfüzyon hasarında olan olaylar dizisi	17
<b>Şekil 7:</b> Lökosit endotel etkileşiminde lökosit göçü	18
<b>Şekil 8:</b> Ratların sağ arka bacaklarının preoperatif çizimi	32
<b>Şekil 9:</b> Cilt insizyonu yapılarak femoral arter ve venin ortaya konması	33
<b>Şekil 10:</b> Yumuşak dokuların femoral arter ve ven korunarak sirküler olarak femura kadar insize edilmesi	33
<b>Şekil 11:</b> Femur osteotomisi sonrası rat arka bacak kompozit ada flebinin oluşturulması	34
<b>Şekil 12:</b> Femoral arter ve venin klempelenmesi ve iskemi oluşturulması	34
<b>Şekil 13:</b> Ratlarda 4 saatlik iskemi sonrası arka bacağın makroskobik görünümü	35
<b>Şekil 14:</b> Arka bacak kompozit ada flebinin yerine sütüre edilmesi	36
<b>Şekil 15:</b> Reperfüzyon başlangıcında ratların arka bacak kompozit flebinin makroskobik görünümü	37
<b>Şekil 16:</b> 24 saatlik reperfüzyon sonrası sakrifiye edilmeden hemen öncesinde arka bacağın makroskobik görünümü	37
<b>Şekil 17:</b> Kas biyopsilerinin gastrokinemus kasından alınması	39
<b>Şekil 18:</b> Doku MPO düzeyleri	41

	<b><u>Sayfa</u></b>
<b>Şekil 19:</b> Serum MPO düzeyleri	41
<b>Şekil 20:</b> Doku MDA düzeyleri	43
<b>Şekil 21 :</b> Serum MDA düzeyleri	43
<b>Şekil 22:</b> Doku GSH düzeyleri	45
<b>Şekil 23:</b> Serum GSH düzeyleri	45
<b>Şekil 24:</b> Doku IL2 düzeyleri	47
<b>Şekil 25:</b> Serum IL2 düzeyleri	47
<b>Şekil 26:</b> Doku IL10 düzeyleri	49
<b>Şekil 27:</b> Serum IL10 düzeyleri	49
<b>Şekil 28 :</b> Doku TNF düzeyleri	51
<b>Şekil 29:</b> Serum TNF düzeyleri	51

## I. GİRİŞ

Doğumsal veya edinsel doku defektlerinin uygun şekil ve fonksiyonda onarımı Plastik Cerrahi'nin temel konularındandır. Doku defektlerinin onarımında en basit yöntemden başlayıp "rekonstrüksiyon merdiveni" içinde daha komplekse doğru gidilmelidir. Bu sıra primer onarım, deri grefti, lokal flep, mikrovasküler serbest flep şeklinde daha kompleks rekonstrüktif girişimleri sıralamıştır. Rekonstrüktif gereksinimleri karşılayan en basit seçeneği uygulamak, yapılan prosedür başarısız olması durumunda bir üst yöntemle geçilebilirse de çoğu zaman defektlerinin kapatılmasında en uygun fonksiyonel ve estetik yaklaşım için üst basamaktaki yöntemler direkt tercih edilebilmektedir(1).

Rekonstrüktif cerrahide flep tercih edildiği durumlarda, planlanan flebin boyu uzadıkça flep yaşayabilirliğinde azalma ve distalde belirgin olmak üzere flep dokusunda kayıp görülmektedir(2). Artan anatomik çalışmalar ile flep tasarımlarının ve anjiozomların tanımlanmasına rağmen, halen flep nekrozu rekonstrüktif cerrahi için sorun teşkil etmektedir(3,4).

Rekonstrüktif cerrahide flep sağkalımını belirleyen en önemli etkenlerden birisi iskemi-reperfüzyon hasarıdır. İskeminin süresi ve şiddeti özellikle mikrovasküler cerrahide çok daha fazla önem kazanmaktadır. Plastik cerrahi alanında son yıllarda pek çok çalışma yapılmış olmasına rağmen, reperfüzyon hasarının patofizyolojisi halen tümüyle anlaşılabilmiş değildir(5). İskemik doku anaerob metabolizmaya yönelir ve oksijen, glikoz, ATP seviyeleri düşerken; CO<sub>2</sub> ve laktik asit seviyeleri artmaktadır(6). Anaerobik metabolizmaya birlikte toksik süperoksit radikallerin üretiminde artış olur. İskemi sonrası tekrar oksijenlenme sırasında süperoksit anyonu oluşur. Bu anyon diğer oksijen radikal türlerine dönüşerek doğrudan hücre hasarı yapar(7,8). Reaktif oksijen ürünleri konsantrasyonu başlıca GSH, GSH-Px, SOD, CAT antioksidan sistemleri ile kontrol edilir(9).

Bu çalışmada antioksidan özelliği olan Pycnogenolün, iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmada etkin olup olmayacağını test edilmesi planlandı.

## II. GENEL BİLGİLER

### 2.1. FLEP TANIMI VE TARİHÇESİ

Flep, vasküler beslenmesi korunarak, bir bölgeden başka bir bölgeye taşınabilen doku parçalarıdır(1). Hazırlanan flep birden fazla doku içeriyorsa, adına “kompozit” terimi eklenir.

Flep teriminin kökeni tek taraftan bağlanan geniş ve gevşek olarak asılı olan anlamına gelen; Flamenkçe bir sözcük olan ‘flappe’ kelimesinden gelmektedir(10). Yaklaşık 3000 yıldan beri flepler kullanılmaktadır. Bilinen ilk flep kullanımı M.Ö. 1000 yılında Hindistan’da Kanghiara ailesi tarafından gerçekleştirilmiş ve burun defektlerinin onarımı pediküllü alın flebi ile yapılmıştır. M.Ö 600 yılında Sushruta Samhita’nın burun rekonstrüksiyonu için alın ve yüzde pediküllü flepleri kullandığı rapor edilmiştir. Celsus M.Ö. 25’de ilerletme fleplerini tariflemiştir. İlk Plastik Cerrahi kitabı 1597 yılında Gaspare Tagliacozzi tarafından yayınlanmıştır. Tagliacozzi burun rekonstrüksiyonunda koldan tüp haline getirdiği pediküllü flebi kullanmıştır. Bu flepler nasıl beslendikleri bilinmeden rastgele keşfedilmiştir. İngiliz cerrah Carpue 1814’de başarılı alın fleplerini, burun rekonstrüksiyonunda uygulamıştır. Horner 1837’de Z-plasti’yi tanıtmıştır. Flep konusunda asıl gelişmeler derinin kanlanmasıyla başlamıştır. Alman Anatomist Carl Manchot cildi besleyen damarların anatomik dağılımlarını 1889’ da yayınlamış ve deri beslenmesinin fizyolojisi daha iyi anlaşılabilmiştir(10). Spalteholz 1893’de cildin fasyokutan kanlanmasını tariflemiştir. Monks 1898’de tek aşamalı pediküllü ada flebini uygulamıştır. Eser 1918’de V-Y ilerletme flebini tariflemiştir. Bundan sonra 1950 ve 1960’larda Owens, McGregor, Bakamjian, ve diğer araştırmacılar tarafından saçlı deri, alın, boyun, göğüs ön duvarı ve supraklavikuler bölgede pek çok aksiyel paternli flep tanımlanmıştır. Ponten’in 1981’de belli bir deri adasının beslenmesini sağlayan septokütan perforatörleri fark etmesi, fasyokütan flep kavramının gelişmesine yol açmıştır. Taylor ve Palmer 1987’de “anjiozom (angiosome)” kavramını tanımlayarak flep cerrahisine büyük katkıda bulunmuşlardır(10). Mikroskop ile yüksek büyütme altında ince sütürler kullanılarak küçük damarlarda onarımın mümkün

olduğunu görülmesi sonrası hayvanlar üzerinde deneysel serbest flep transferi üzerine çalışmalar başlamış ve ilk başarılı serbest flep operasyonu Daniel ve Taylor tarafından 1973 yılında tariflenmiş; bacadaki kompleks bir defekti serbest kasık flebi ile onarmışlardır. Serbest flep uygulamaları 1980'den beri oldukça gelişmiş ve yaygın şekilde kullanılır olmuştur (10-11)

## 2.2. FLEP SINIFLANDIRMASI

Flepler; kanlanma kaynağı, flebi oluşturan dokuların kompozisyonu, aktarılma şekilleri ve yerlerine göre sınıflandırılabilirler (1).

### 2.2.1. Doku içeriğine göre flepler

- a) Deri flepleri (kutanöz)
- b) Kas flepleri (muskuler)
- c) Fasya flepleri
- d) Kompozit doku flepleri (muskulokütan, fasyokütan, osseomuskulokütan vb.)

### 2.2.2. Aktarım şekline ve yerine göre flepler

2.2.2.1. Lokal flepler: Verici alana komşu olan defektlerin kapatılmasında kullanılırlar. Alıcı alan ile renk ve yapı açısından benzer özelliklere sahiptir.

a) Rotasyon flepleri: Sabit bir nokta etrafında yarım daire şeklinde hazırlandığından dolayı pivot fleplerdendir. Defekt alanına rotasyon şeklinde aktarılır. Bu dönüşün artırılması için flebin tabanına "back cut" eklenmeli veya Burrow'un tarif ettiği gibi üçgen şeklinde doku çıkarılması faydalıdır. Verici alan deri grefti veya primer onarım ile kapatılır.

b) Transpozisyon flepleri: Bitişindeki bir defekti kapamak için hazırlanan, bir eksen üzerinde yanlara doğru hareket edebilen dörtgen fleptir. Pivot fleplerin diğeridir. Verici alan deri grefti, primer onarım veya sekonder flep ile kapatılabilir.

c) İnterpolasyon Flepleri: Hareket özelliğine göre aslında bir transpozisyon flebidir. En önemli özelliği donör saha ile defekt alanı arasında sağlam doku

bulunmasıdır. Pedikülü bitişik dokunun altından veya üstünden geçer. Flep revaskülarize olduğunda pedikül ayrılır.

d) İlerletme flepleri: Herhangi bir rotasyon veya lateral hareket olmaksızın, derinin esnetilerek direkt olarak defekte doğru düz bir eksen üzerinde kaydırılmasıdır. Modifikasyonları ise tek pedikül ilerletme, V-Y ilerletme ve bipediküllü ilerletme flepleridir. V-Y ilerletme flepleri; parmak ucu defekti onarımında, dudaktaki küçük çentiklerin giderilmesinde ve nazal kolumella uzatılmasında sıklıkla kullanılan bir ilerletme flebi yöntemidir.

2.2.2.2. Uzak flepler: Alıcı alana uzak bir bölgeden hazırlanan fleplerdir.

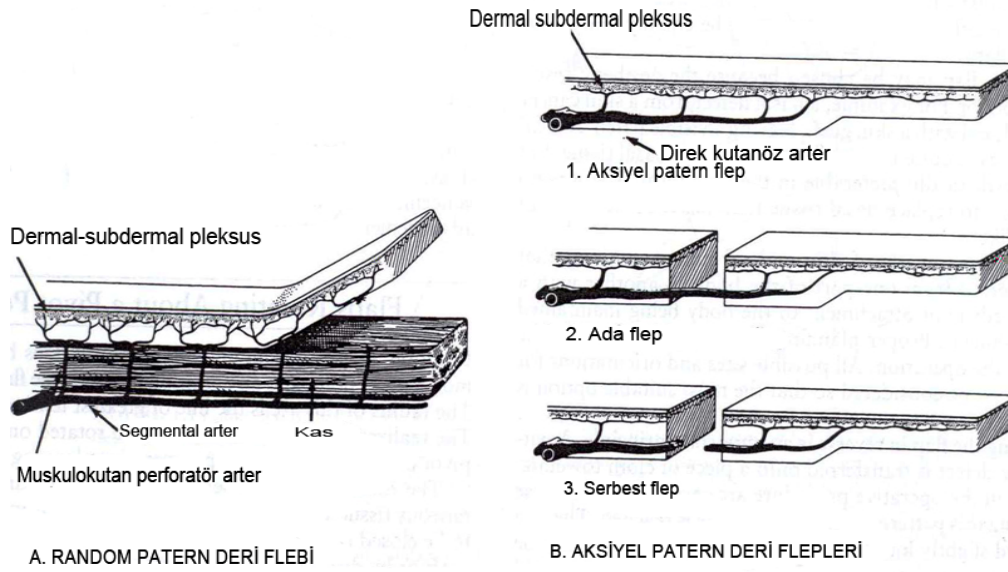
a) Pediküllü Uzak Flepler: Defekt alanı lokal fleplerle kapatılamıyorsa uzak bölgeden pediküllü flep uygulanabilir. Flebin kendi dolaşımının başlaması için 3 hafta beklenip pedikül ayrılır. Çapraz kol, çapraz bacak ve kasık flebi örneklerdir.

b) Serbest flepler: Mikrocerrahideki gelişmeler sayesinde son dönemlerde popülerize olmuştur ve bu gelişme nedeniyle pediküllü uzak fleplere rağbet azalmıştır. Flep spesifik arter ve veni ile taşınarak defekte aktarılır ve flebin dolaşımı alıcı alanda arter ve ven anastomozu ile sağlanır.

2.2.3. Kanlanma kaynağına göre flepler

a) Random flepler: Lokal deri flebi olarak bilinirler, subkutan pleksustan beslenirler. Spesifik arteriyel- venöz sistemi yoktur. Herhangi bir bölgeden hazırlanabilirler. Boy/en oranına göre boyutları sınırlandırılır(1).(Şekil 1)

b) Aksiyel flepler: Tanımlanmış arteriyel-venöz sistemi olan deri flepleridir. Uzun aksı boyunca subkutan doku içerisinde uzanan spesifik direkt kutanöz arter ve ven içerir. Flebin boyu daha uzun hazırlanabilir, direkt kutanöz arterin uzandığı bölgenin distalinde, rastgele subdermal pleksustan beslenen distal deride flebe eklenebilir. Bu flep pedikül etrafındaki diseksiyon miktarına göre yarımada, ada flep olarak kaldırılabilir. Ayrıca mikrocerrahi alandaki gelişmeler sayesinde serbest flep olarak da kaldırılabilir(1).



**Şekil 1:** Deri fleplerinin vasküler anatomiye göre sınıflaması. Place M. J., Herber S. C. and Hardesty R. A. Basic techniques and principles in plastic surgery. In Aston S. J., Beasley, R. W., Thorne C. H. M. (Eds.), Grabb and Smith s Plastic Surgery. 5th edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 13-25, 1997

## 2.3. FLEP FİZYOLOJİSİ

### 2.3.1. Derinin Kanlanması

Deri vücudun en büyük organıdır. Derinin dolaşımı zengin ve geniş olmasına rağmen metabolik ihtiyaçları azdır. Bu nedenle mevcut deri dolaşımının az bir kısmı derinin yaşaması için yeterlidir. Bu da deri flepleri için bir avantajdır. Dokuların kanlanması segmental, perforatör ve kutanöz arterlerden sağlanır. Segmental arterler, direkt olarak aorta'dan köken alırlar ve gövde ile ekstremiteleri kanlandıran büyük ana damarlardır. Perforatör damarlar ise segmental ile kutanöz damarlar arasındaki bağlantıyı sağlarlar. Kutanoz perforatörler direkt ve indirekt olarak ikiye ayrılır. Direkt perforatörler (aksiyel veya septokutanöz) kaynak arterden çıktıktan sonra başka bir derin dokuyu beslemeden doğrudan cilde gelirler. İndirekt perforatörler ise (muskulokutanöz) kas ve kemik gibi derin yapıları besleyen damarların küçük terminal dallarıdır.

Fasyal perforatörlerin kaynağına göre fasyokutanöz fleplerin 2 major sınıflaması vardır(12-13) Cormack-Lamberty ve Mathes-Nahai Sınıflaması.

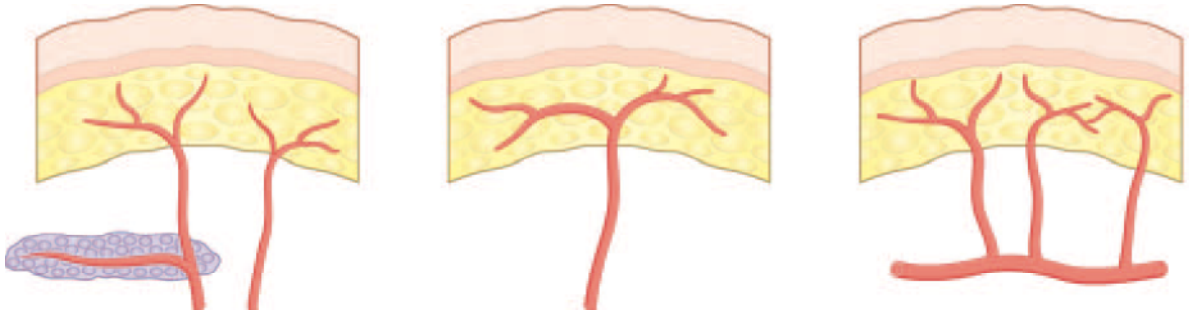


Cormack-Lamberty Sınıflaması (Şekil 2).

Tip A: Multiple perforatörler (sıklıkla indirekt muskulokutan perforatörleri içeren multiple perforatörleri vardır)

Tip B: Tek bir perforatör (sıklıkla direkt olarak cilde giden tek bir perforan pedikülü vardır)

Tip C: Segmental perforatörler (çok sayıda, ancak alttaki kaynak arterden periyodik olarak çıkarlar)



Tip A: Multiple perforatörler

Tip B: Tek bir perforatör

Tip C: Segmental

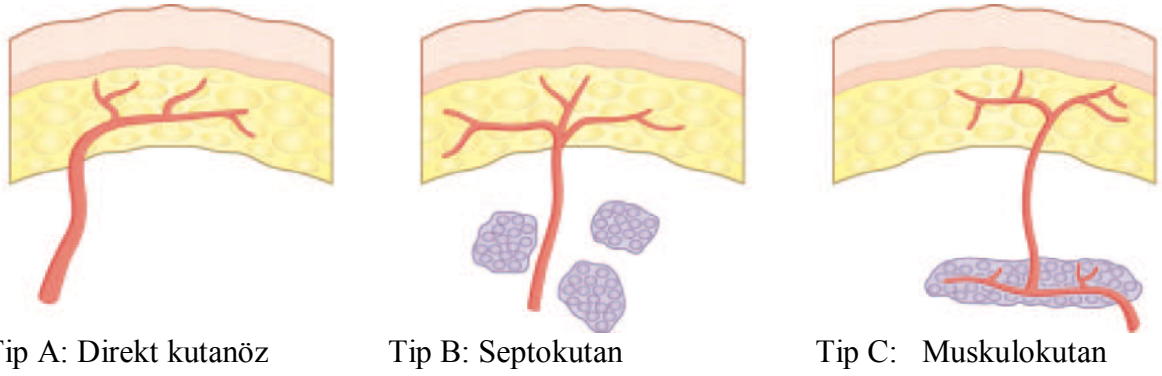
**Şekil 2:** Fasyokutanöz fleplerin Cormack-Lamberty Sınıflaması.(Cormack GC, Lamberty BG. A classification of fascio-cutaneous flaps according to their patterns of vascularisation. Br J Plast Surg. 1984 Jan;37(1):80-7)

Mathes-Nahai Sınıflaması (Şekil 3)

Tip A: Direkt kutanöz perforatör (süperfisial sirkumfleks iliak arter örnek olarak verilebilir)

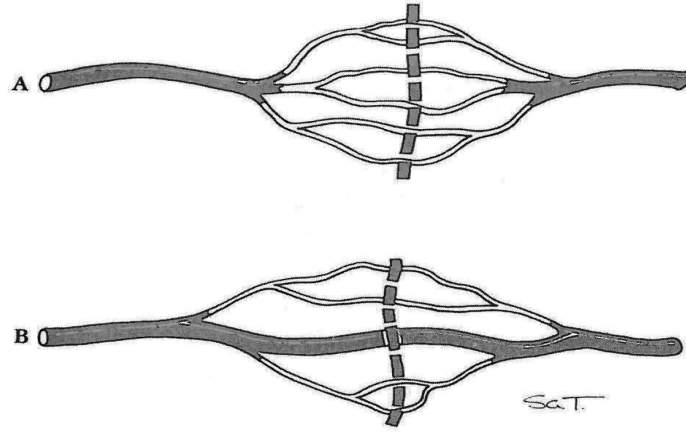
Tip B: Septokutanöz perforatör (interkompartmantal veya intermusküler septum boyunca ilerlerler)

Tip C: Muskulokutanöz perforatör (indirekt)



**Şekil 3:** Fasyokutanöz fleplerin Mathes-Nahai Sınıflaması. (Mathes & Nahai's tripartite system of fasciocutaneous flaps is based on the three major types of deep fascial perforators: Flaps and Reconstructive Surgery, Wei F-C, Mardini S, Saunders, 2009: p: 9)

Birbirine komşu kutanöz damarlar arasında bağlantıyı sağlayan çapı değişmeyen gerçek anastomozlar veya çapı daralmış olan choke anastomozları vardır (Şekil 4). Bu choke damarları deride çok fazladır ve derinin kan akımı regülasyonunda önemlidir. Taylor ve Palmer 1987'de "anjiozom (angiosome)" kavramını tanımlayarak flep cerrahisine büyük katkıda bulunmuşlardır. Anjiozom, tek bir kaynak arter tarafından beslenmesi sağlanan deri, deri altı ve derin doku kompozit (bileşik) ünitesidir. Vücudu oluşturan pek çok anjiozom arasındaki bağlantı, çapında değişiklik olmayan gerçek (basit) anastomotik arterler veya çapı daralmış "choke" (retiform) anastomotik damarlarla olur. Bir deri flebi boyunca kutanöz perforatörleri kesilerek stratejik geliştirme işlemi yapıldığında; bu "choke" damarlar genişleyip gerçek anastomoz çaplarına ulaşarak distal flebe kan akımını artırır(Şekil 4) (14).



**Şekil 4:** A: Choke anastomozlar, B: Gerçek anastomozlar

Taylor G.I. The Blood supply on the skin In: Grabb and Smith's Plastic Surgery. Aston SJ, Beasley RW., Thorne CH (Eds.). 6th Ed. Lippincott Williams&Wilkins. Philadelphia: 2009: p: 33-41

### 2.3.2. Flep Kan Akımının Regülasyonu

Deri kan akımı sistemik ve lokal olarak düzenlenir. Sistemik kontrol nöral ve hümorale mekanizmalar kullanılarak yapılır. Nöral regülasyon predominanttır. Nöral regülasyonda sempatik lifler; alfa adrenerjik reseptörleri etkileyerek vazokonstriksiyon, beta adrenerjik reseptörleri etkileyerek vazodilatasyon oluşturur. Sempatik liflerin bu etkisi, arteriol ve arteriovenoz anastomoz düzeyinde vasküler düz kas tonusunu düzenleyerek olur. İlaveten sempatik lifler arteriovenoz anastomoz düzeyinde mevcut serotonerjik reseptörleri etkileyerek vazokonstriksiyon oluşturur(15).

Hümorale regülasyon ise sistemik vazoaktif maddelerin spesifik reseptörlere etkisi sonucunda ortaya çıkar. Sistemik vazoaktif maddelerden epinefrin ve norepinefrin  $\alpha$ - adrenerjik reseptörleri etkileyerek vazokonstriksiyon oluşturur. Diğer sistemik vazoaktif maddelerden; serotonin, tromboxan A2 ve PGF2 $\alpha$  vazokonstriksiyon; PGE1, PGI2 (prostasiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C4 ve D4 vasodilatasyon oluşturur(Tablo I).

Kan akımının lokal kontrolü tüm vücut dokuları için, özellikle de iskelet kası gibi yüksek metabolik aktiviteye sahip alanlarda önemlidir. Lokal düzeyde deri kan akımını etkileyen metabolik faktörler hiperkapni, hipoksi ve asidozdur. Bunların hepsi vazodilatasyona neden olur. Doku perfüzyon basıncının artması 'miyojenik refleksi' tetikleyerek vazokonstriksiyon oluşturur. Bu etki arteriyal perfüzyon basıncından bağımsız olarak kapiller kan akımını sabit devam ettirmeye çalışır. Lokal hipotermi damar düz kaslarında vazokonstriksiyona neden olarak lokal kan akımını azaltır. Hipertermi ise vazodilatasyon yaratarak buna ters etki gösterir(15).

Reolojik faktörler tipik olarak sadece anormal durumlarda kan akımını etkiler. Derin aneminin reolojik özellikleri iyileştirip ve flep kan akımını artırdığı bazı çalışmalarda gösterilmiştir(16). Fakat başka çalışmalarda flep yaşayabilirliğine hiçbir etkisinin olmadığı veya çok az etkisinin olduğu gösterilmiştir(17). Reolojik faktörlerden anormal yükselme yapan polisitemi veya orak hücre hastalığında, özellikle flep uç kısımlarındaki yaşayabilirlik ve perfüzyonu ciddi sıkıntıya girer(15).

Kas fleplerinde kan akımının düzenlenmesi aynı konseptlere bağlı olsa da bazı özel farklılıklar mevcuttur. Kas dokusunun kapiller yoğunluğu deriden fazladır ve arteriovenoz şantlar mevcut değildir. Kas dokusu ve benzer yüksek metabolik aktiviteye sahip dokularda kan akımının düzenlenmesi, metabolik ihtiyaca bağlı olarak değişir. Tehlike durumlarında salınan epinefrin deride vazokonstriksiyon oluştururken, kas dokusunda vazodilatasyona neden olur. Çünkü kas dokusu deri gibi termoregülasyondan sorumlu bir organ değildir. Kas dokusunda ısı değişikliklerinin kan akımı üzerine etkisi çok daha azdır(15).

**Tablo I:** Flep Kan Akımının Düzenlenmesi

<b>Regülasyon</b>	<b>Kategori</b>	<b>Ajan</b>	<b>Mediatör</b>	<b>Etki</b>
Sistemik	Nöral	Sempatik	adrenerjik reseptör	Vasokonstriksiyon
	Nöral	Sempatik	adrenerjik reseptör	Vasodilatasyon
	Nöral	Sempatik	Seratonerjik reseptör	Vasokonstriksiyon
	Hüморal	Noepinefrin, epinefrin	adrenerjik reseptör	Vasokonstriksiyon
		Serotonin, Tromboksan A2		Vasokonstriksiyon
Lokal		PGE1, PGI2 Histamin LTC4, LTD4		Vasodilatasyon
		Hipoksi, asidoz, hipertermi	Artmış doku kanlanması	Vasokonstriksiyon
		Hipotermi	Artmış doku kanlanması	Vasokonstriksiyon

### 2.3.3. Fleplerde neovaskularizasyon patogenezi

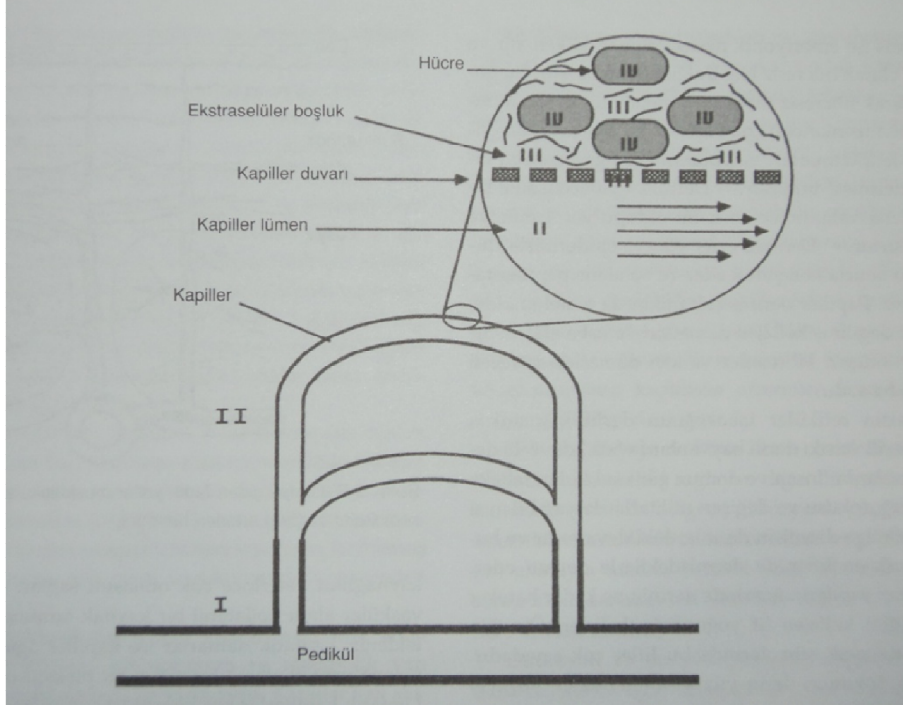
Flep elevasyonu dokuda kan akımını sağlayan dengenin ciddi şekilde bozulmasına neden olur. Akut kaldırılan bir flepte flep yaşamını tehdit eden en önemli öge vasküler kaynağın yetersiz olması ve bunun sonucunda da iskemi gelişmesidir. Aktarılan flep ile yerleştiği yatak arasında yeni vasküler kanalların zamanında oluşması iskemiye düzeltir. Yaşayan fleplerde kan akımı kademeli olarak artar. Flep uygun bir alıcı bölgedeysen ilk 2 gün içinde bir fibrin tabakası oluşur. Neovaskularizasyon flep transpozisyonundan 3-4 gün sonra başlar. Flep pedikülünün ayrılmasına izin verecek kadar uygun revaskularizasyonun 7 gün gibi erken bir dönemde sağlandığı hayvan modellerinde ve insanlarda gösterilmiştir. Revaskularizasyon sırasında yeni damarların gelişiminde vasküler endotelial hücreler ana rol oynar. Normalde endotelial hücreler dinlenme durumundadır. Ancak anjiogenik büyüme faktörleri tarafından uyarıldıklarında çok dramatik bir şekilde çoğalırlar. Anjiogenik uyarının varlığı veya yokluğu ile yeni kapillerlerin yeterli düzeyde yeniden yapılanması (remodelling) veya yeniden düzenlenmesi sağlanır. Bazı kapillerler varolan flep damarlarına katılır ancak revaskularizasyonun çoğunda alıcı damarların flep içine doğru direkt büyümesi söz konusudur. Yeni kapillerler anjiogenik bir kaynağa doğru 0,2 mm/gün hızında ilerler. Anjiogenik uyarı kesildiğinde kapiller damarlar geriler ve haftalar içinde yok olurlar. Kontrol edilemez bir neovaskularizasyon döngüsünü önlemek için anjiogenezi inhibe eden mekanizmaların bulunduğu inanılmaktadır (18).

Flep elevasyonu sonucunda derinin venöz dönüşüde bozulur. Elevasyondan sonraki erken dönemde oluşan tam venöz oklüzyon flep yaşamını, yetersiz arteriyel akımdan daha kötü etkiler. Subdermal pleksus venöz dönüşü sağlamak için sıklıkla tek başına yeterlidir. Özellikle pediküllü fleplerde venöz dönüşü korumak için özen gösterilmelidir(18).

Flep elevasyonu sırasında lenfatik drenaj da bozulabilir. Kutanöz lenfatik drenajın azalması interstiyel sıvı basıncını artırır ve kapiller perfüzyonun azalmasına neden olur(18).

Flep elevasyonu sırasında duyuşsal ve sempatik sinirler kesilir. Sempatik bir sinir kesildiğinde sinir ucundan katekolaminler salınır; ayrıca katekolamin reuptake'i de bozulur(19). Lokal bir hiperadrenerjik durum ortaya çıkar ve bunun sonucunda alfa adrenerjik reseptörler aracılığıyla kutanöz damarlarda vazokonstriksiyon gelişir. Sonuçta sempatektominin vazokonstriktör etkisi ile flepteki kan akımı azalır. Depolanan transmitter 24-48 saatte tükenir ve norepinefrin düzeyi azaldıkça kan akımı artar.

Flep elevasyonundan sonra ortaya çıkan metabolik değişiklikler özellikle flebin iskemik distal kısmındadır. Bu metabolik değişiklikler oksijen, glukoz ve ATP seviyelerinde düşme, karbondioksit ve laktik asit seviyelerinde artış şeklinde olur. Sonuçta anaerobik metabolizmaya geçiş ve araşidonik asit derivelerinde artış görülür. Anaerobik mekanizmaya geçişle ilişkili olarak toksik süperoksit radikallerini üretimi artar. Toksik oksijen radikalleri direkt sitotoksik etkiye neden olabilirler. Daha önemli olan özelliği süperoksit anyonunun kemotaktik özellik gösterip, reperfüze alanlarda nötrofil migrasyonuna neden olmasıdır. Sonuçta mikrovasküler dolaşım durabilir. Damar içinde hızla nötrofil birikimi sonucu perfüzyonun ilerleyen şekilde düşmesine iskemi–reperfüzyonla ilişkili “no-reflow fenomeni” denir(15). Bir flebin yaşayabilmesi için 4 farklı perfüzyon bölgesinin de uygun şekilde çalışması gerekmektedir(Şekil 5). Bu perfüzyon bölgeleri kardiyopulmoner, nörovasküler ve lenfatik fonksiyonu içeren makrodolaşım sistemi (1'nci bölge), arteriol, kapil, venül ve arteriyovenöz şantlardan oluşan kapiller dolaşım sistemi (2'nci bölge), kapiller membran ile interstiyel temel maddeyi kapsayan interstiyel sistem (3'ncü bölge) ve hücreler ve hücre membranından oluşan hücresel sistem (4'ncü bölge) dir. No reflow fenomeni'de; flepler için kritik iskemi süresi aşıldığında (random flepler için birkaç saat) 1'nci perfüzyon bölgesinde (makro dolaşım sistemi) akımın olmasına karşın; 2'nci (kapiller dolaşım sistemi) ve 3'ncü bölgede (interstiyel sistem) perfüzyonun olmamasıdır. Reperfüzyon hasarı 2 mekanizma ile gerçekleşir. Bu mekanizmalar, toksik oksijen radikallerinin direkt sitotoksik etkisi ve araşidonik asit derivelerinde artışıdır. PGI<sub>2</sub>, PGE<sub>2</sub> ve PGD<sub>2</sub>'nin vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunu engelleyen; TxA<sub>2</sub> ve PGF<sub>2a</sub>'nın vazokonstriksiyon ve trombosit agregasyonunu indükleyen etkileri vardır(17).



**Şekil 5:** Perfüzyon bölgeleri. 1'nci bölge: makrodolaşım sistemi, 2'nci bölge: kapiller dolaşım sistemi, 3'ncü bölge: interstiyel sistem, 4'ncü bölge: hücrel sistem. Byrne PJ, Goding GS: Skin Flap Physiology and Wound Healing. In: Cummings Otolaryngology: Head And Neck Surgery, Cummings CW, Haughey BH, Thomas JR, Harker LA: 5th Edition: Vol 1: 146-160

#### 2.3.4. Flep Kaybı Nedenleri

Fleplerde kayıp en sık iskemi nedeniyle olur. Deri fleplerinde iskemi birçok nedene bağlı olabilir, bu nedenler ekstrensek ve intrinsek olarak sınıflanabilir. Ekstrensek nedenler infeksiyon, sistemik vasküler hastalıklar, yüksek veya düşük kan basıncı, sigara kullanımı, yetersiz beslenme, serebrovasküler hastalıklar, KOAH, KKY, immünsüpresyon, radyasyon tedavisi, aritmiler, obezite, ileri yaş ve lokal faktörler olarak da flebe bası, flep ve pedikülde gerginlik, anostomozda trombüs olması, pedikülde katlanma olması, cerrahi yetersizlik ve enfeksiyondur. İntrensek tek neden ise flepte yetersiz kan akımıdır(21,22).

Flep nekrozunda kritik faktörlerden birisi de flebin içeriğidir. Deri flepleri, kas fleplerine göre daha az kanlansa da iskemiye dayanıklılığı daha fazladır. Bu da derinin daha az metabolik ihtiyacının olması ve iskemiye daha dirençli olmasındandır. Distal flep nekrozunda, flep distalindeki perfüzyon basıncında



düşme veya arteriollerde vazokonstriksiyon nedeniyle kan akımının yetersiz olması en önemli rolü oynar. Reinisch yaptığı çalışmada arteriovenöz şantların flep kaybında rol oynadığını göstermiştir. Akut olarak eleve edilmiş fleplerde distal arteriovenöz şantın kapiller yatağa yeterli besin akımını engellediğini tespit etmiştir(21). Kerrigan ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda ise arteriovenöz şantın distal flep canlılığını belirlemede çok önemli olmadığı belirtilmektedir. Distal flep nekrozu, pedikül damarlarına yeterli uzaklıkta perfüzyon basıncında düşme veya küçük arteriollerde vazokonstriksiyondan dolayı yetersiz kan akımının bir sonucu olduğunu düşünmektedirler(21). Pediküllü flebin elevasyonundan sonra hasara lokal cevap olarak sempatektomi, katekolamin salınımı olmakta ve proksimal canlı bölümünde kan akım azalmaktadır. Böylece distal bölümde lokal iskemi oluşmakta ve vazokonstriksiyonla sonuçlanmaktadır. Flebin proksimal bölümünden yeterli perfüzyon basıncı olmaması nedeniyle distal flep nekrozu oluşabilmektedir(23,24,25). Flep kaldırıldıktan sonra özellikle flebin distalinde iskemik alanda metabolik değişiklikler olur. İskemik dokuda karbondioksit(CO<sub>2</sub>) ve laktik asit düzeyi artar, oksijen(O<sub>2</sub>), glukoz, ATP düzeyleri düşer ve anaerobik metabolizmaya dönüş olur. PGI<sub>2</sub> ve tromboksan seviyesi artar, glukoz tüketimi artar. Glukoz tüketimi postoperatif 3. günde en yüksek seviyededir ve 7. günde normale döner. Bu anaerobik metabolizma sırasında toksik oksijen radikalleri artar ve hücrel hasara neden olurlar, lokal akut inflamasyonu, nötrofil birikimini ve adhezyonunu tetiklerler. Koruyucu süperoksit dismutaz enzim seviyeleri flep distalinde azalır. Nötrofiller iskemi reperfüzyon hasarında iki şekilde rol oynar. Direk damar endotel hasarı oluşturarak damar bütünlüğünü bozabilir, damar bütünlüğü bozulması ödem, kanama ve tromboza neden olur ve bu da iskemiyi arttırır. Nötrofillerin diğer rolü de damar lümeninde agregre olarak mikrovasküler oklüzyon oluşturup iskemiyi arttırmalarıdır(26).

Eleve edilen flepte akut patofizyolojik olaylar özetlenecek olursa; elevasyon esnasında, cilt kan damarları ve sempatik sinirler kesilir. Bu kan akımında dramatik değişimle sonuçlanır. İlk 18 saat içinde katekolaminlerin salınması ve kan akımında azalmaya sekonder olarak perfüzyon basıncında düşme olur. Flep distalinde ilk 12 saat süresinde yetersiz kan akımı vardır, geri dönüşsüz

iskemi flep nekrozu ile sonuçlanır. İskemi aşıkâr olduğunda, pek çok metabolik vazodilatatör (CO<sub>2</sub>, laktat, prostaglandinler, histamin, v.b.) hep birlikte etki ederek yavaş yavaş kan akımını artırır. Postoperatif 12-48 saatlerden itibaren sempatik vazokonstriktörlerin azalmasıyla kan akımı daha da artar. Bu etkilerden yalnızca flep proksimali yararlanır, flep distalindeki iskemik hasar 12 saatten sonra geri dönmez. Kısa süre içinde yeni bir denge kurulur, flep yatağında ve periferde yara iyileşmesi başlar. Sağlıklı zeminde 4- 5. günlerde flep orijinal primer kan desteği olmaksızın yeterli kollateral dallanmalarla desteklenir(26).

## 2.4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI

### 2.4.1 İskemi

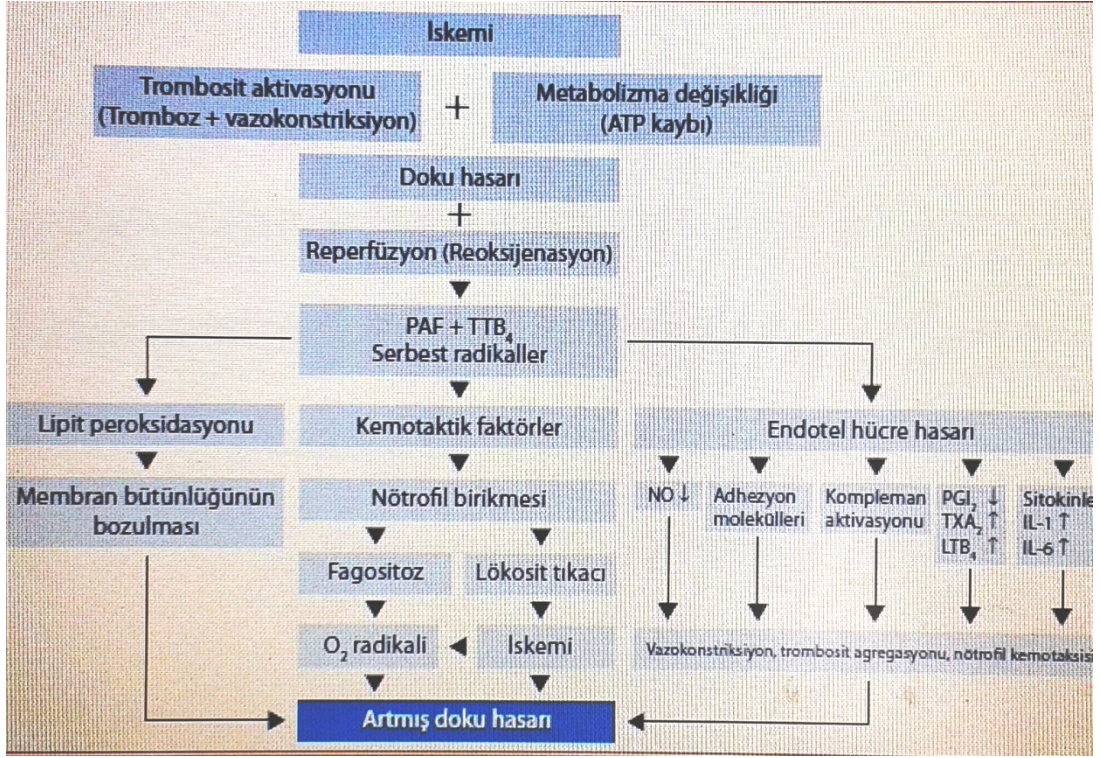
Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır(27-30). Dokuların iskemiye dayanıklılığı birbirinden farklıdır. İskelet kasları iskemiye uzun süre dayanabildiği halde nöronlarda dakikalar içinde geri dönüşümsüz yıkım ortaya çıkabilir. Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP'nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>++</sup> iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder(27,28).

#### 2.4.2.Reperfüzyon ve Reperfüzyon Hasarı

Reperfüzyon, iskekiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden düzenlenmesidir. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak uzun süre iskemik kalmış dokunun oksijenlenmesi dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır (31,32).

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir(27,30,33,34).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskemi-reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Bu faktörler; Ksantin Oksidaz, Nötrofillerin aktivasyonu, Endotelial faktörler, Araşidonik asit metabolitleri, Nitrik Oksit, Endotelin, Trombosit aktive edici faktör (PAF), Komplemanlar, Sitokinler, Prostaglandinler, Katekolamin oksidasyonudur(Şekil 6).



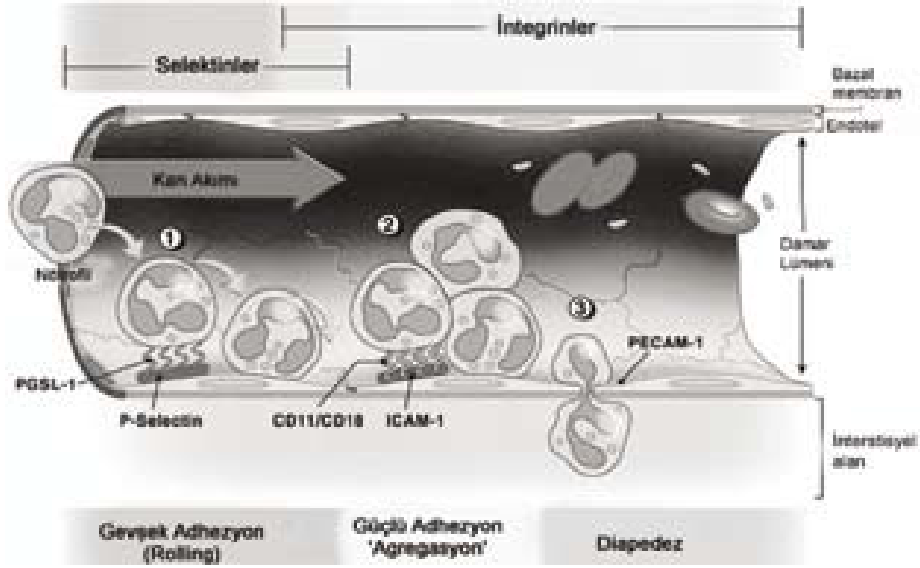
**Şekil 6:** İskemi – reperfüzyon hasarında olan olaylar dizisi Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. Mol Nutr Food Res 2007; 51: 1345-1352.

#### Ksantin Oksidaz Yolu

Postiskemik dönemde, iskemik dokudaki serbest radikallerin en belirgin kaynağı ksantin oksidaz enzimidir. Bu enzim “dehidrojenaz” ve “oksidaz” aktivitesine sahip iki şekilde bulunur. Çalışmalarda iskemi sırasında ksantin dehidrojenaz enziminin kalsiyum aracılı bir proteaz katalizörlüğünde ksantin oksidaza dönüşmesi, intestinal dokuda 10 saniye, kardiyak kasta 8 dakika, karaciğer, dalak, böbrek ve akciğerde 30 dakika sürmektedir. Bu da değişik dokuların iskemi-reperfüzyon hasarına neden farklı oranlarda cevap verdiği konusunda açıklayıcı olmaktadır. Hipoksantin ve ksantin oksidasyonu serbest radikallerin oluşumuna yol açar(27,33,35).

## Nötrofiller

İskemi-reperfüzyonun yol açtığı mikrovasküler hasar için nötrofil ve endotelial hücre ilişkisi gerekmektedir. İskemi sırasında ve daha ağırlıklı olarak bunu takip eden reperfüzyon döneminde postkapiller venüllerde endotele artmış nötrofil adhezyonu görülür ki bunun iskem-reperfüzyona bağlı barsak disfonksiyonunda önemli rolü vardır.(Şekil 7) PAF, LB4 ve serbest oksijen radikalleri bu durumun en muhtemel kimyasal mediatorleridir(28,36).



**Şekil 7:** Lökosit endotel etkileşiminde lökosit göçü( İskemi – reperfüzyon hasarında olan olaylar dizisi Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury. Mol Nutr Food Res 2007; 51: 1345-1352.)

## Endotelial Faktörler

Vasküler endotelial çeper pek çok lokal hormon ve otakoid salgılayarak vasküler düz kas tonusunu düzenler (27,28).

### 1-Araşidonik asit metabolitleri

a)-Prostasiklin (PGI<sub>2</sub>): Endotel hücrelerinden serbestlenen ilk vazodilatör ajan olan PGI<sub>2</sub> endotelial yüzeylerde trombosit agregasyonunu önleyen güçlü bir vazodilatatördür.

b)-Tromboxan A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>): Araşidonik asitten siklooksijenaz yardımı ile oluşan TxA<sub>2</sub> trombositleri agreste eder ve vazokonstriktör etkisi vardır. Reperfüzyon, prostaglandin üretiminin en potent uyarandır. TXA<sub>2</sub>, iskemi-reperfüzyonda endoteliuma nötrofil adhezyonunu indükleyen güçlü bir kemotaktik maddedir.

c)-Lökotrien B<sub>4</sub> (LB<sub>4</sub>): Lökotrienler, iskemi- reperfüzyon boyunca endotelial disfonksiyonda önemli rol oynayan ve lipooksijenaz yoluyla oluşan araşidonik asit metabolitleridir. LB<sub>4</sub> nötrofil yüzeyindeki spesifik reseptörlere bağlanır. Adhezyon moleküllerinin aktivasyonunu, endotelial hücrelere yapışmayı, serbest oksijen radikallerinin ve proteazların üretimini sağlar. Üç saatlik iskemi periyodu mukozal LB<sub>4</sub> seviyelerini değiştirmezken, reperfüzyonun izlediği aynı süreli iskemi mukozal LB<sub>4</sub> seviyelerinde %200 ila 600 oranında artışa yol açmaktadır(38).

2- Nitrik Oksit (NO): Endotel türevli nitrik oksit veya relaksing faktör (ENDO, EDRF)olarak da bilinen NO, asetil kolin uyarısı, hipoksi, endotoksin, hücrel zedelenme veya mekanik kesilme stresine yanıt olarak dolaşıma salınabilmektedir. Yarı ömrü birkaç saniye olan, diffüze olabilen bir maddedir. NO kendiliğinden nitrat ve nitrite ayrışır. Septik şok ve travmada, nitrit ve nitrat metabolitleri ile ölçülen NO düzeyleri yüksekliğinin, düşük sistemik vasküler direnç ve yükselmiş endotoksin düzeyleri ile ilişkili olduğu kanıtlanmıştır(29). Hücrel hasarın yanında büyük miktarlardaki NO parakrin ve otokrin fonksiyonların bozulmasına, bölgesel kan akımında dağılım bozukluğuna, barsak motilitesinde azalmaya ve permeabilitesinde artışa yol açar(37).

3. Endotelin: Arter ve venlerde kontraksiyona neden olan en güçlü vazokonstriktördür. İskemik kalmış bir barsağın ürettiği endotelinin, intestinal iskemi-reperfüzyon hasarının sistemik bir hasara dönüşmesinden sorumlu olabilecek güçlü bir aday olduğu ileri sürülmektedir(29).

### Komplemanlar

Komplemanların arka arkaya aktivasyonu, anaflatoksin C3a ve C5a'nın üretimine yol açar. Nötrofiller üzerindeki etkileri ise kemotaksis, endotele adhezyonun artışı, serbest oksijen radikallerinin üretim ve salınmasını sağlamaktır(28,29).

### Sitokinler

Reperfüzyon sonrası, dolaşımda IL-1, IL-6 ve Tümör Nekrozis faktor-a (TNF-a) gibi sitokinler gözlenir. Bu ajanlara karşı antagonistler kullanılarak, hem IL-1'in hem de TNF-a'nın vasküler yaralanmaya katkıda buldukları ve endotel adhezyon moleküllerini arttırdıkları gösterilmiştir(28,29). İskemi-reperfüzyonda sitokin salınımının bilinmesine rağmen bu sitokinlerin permeabilite üzerine olan etkilerinin doğrudan mı yoksa hücre adhezyon molekülleri ekspresyonu ve nötrofil adhezyon aktivasyonu yoluyla mı olduğu bilinmemektedir(36).

Platelet Aktive Edici Faktör (PAF) Fosfolipaz A2'nin etkisiyle endotel hücreleri tarafından membran fosfolipidlerinden üretilir. Çok çeşitli inflamatuvar reaksiyonda (ARDS, Akut pankreatit, İnflamatuvar barsak hastalığı, glomeruler hasar vs.) etkin olduğu gözlenen bir substrattır(28,32,38). Trombositlerin şekil değişikliğine, agregasyonuna, ve granül içeriğinin salınmasına yol açan oldukça kuvvetli bir ajandır. Ek olarak PAF kuvvetli bir nötrofil kemoataktan ve aktivator bir maddedir ve TNF-a üretiminde önemli bir rol oynar. Dokuların reperfüzyonu sonucu lökositlerin aktivasyonuna, adhezyon ve diapedezine ve aynı zamanda vasküler permeabilitede artışa yol açar. Pek çok çalışma PAF'ın in vitro ve in vivo ortamda lökositlerin mikrovasküler endotele adhezyonunu arttırdığını göstermiştir. PAF'ın, reperfüzyon sonucu gerçekleşen kemotaksisin bir düzenleyicisi olduğu düşünülmektedir(28,29,49).

#### 2.4.3. Serbest Radikaller ve Reperfüzyon Hasarındaki Roller

Serbest radikaller, en dış yörüngesinde tek sayıda elektron içeren, ileri derecede reaktif, kısa ömürlü, ve anstabil moleküllerdir. Moleküler oksijenin indirgenmesi ve eksitasyonu ile çok değişik serbest oksijen radikalleri üretilir. (28,29,35). Oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu

sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali ( $O_2^-$ ) oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali ( $H_2O_2$ ) oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali ( $OH^-$ ) oluşur. Organizmada bu serbest radikaller dışında hidrojen peroksit, hipoklorik asit gibi radikal olmayan, bununla birlikte serbest radikal oluşturma potansiyelinde olan zararlı oksijen türleri de oluşabilmektedir. Diğerleriyle karşılaştırıldığında  $O_2^-$  radikali yüksek elektron aktivitesine sahiptir ve çok reaktiftir. Ancak oksijen radikallerinden en aktif olanı  $OH^-$  radikalidir(28,35). Hücreler serbest oksijen radikallerinin hasarına bağışık değildir. Ancak genellikle glutatyon ve katalaz ile oksijen hasarına karşı korunmuşlardır. İskemik dokularda, serbest oksijen radikali üreten intrasellüler mekanizmalar tam aktive edilmiş durumdadır. Ancak oksijen sağlanmasındaki eksiklikten dolayı fonksiyon görmezler. Kan akımı ve oksijen sağlanmasının restorasyonu ile büyük miktarlardaki serbest oksijen radikali üretilerek reperfüzyon hasarı indüklenir(29). Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Eğer bir serbest radikal, radikal olmayan bir molekülle reaksiyona girerse, binlerce reaksiyondan oluşan reaksiyon zincirlerini başlatır. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar(35). Bu hasarlanma özetle şu mekanizmalarla olur:

a-)Lipid Peroksidasyonu: Serbest radikallerin hücrede başlattığı en önemli ve zararlı etki lipid peroksidasyonudur. Çoklu doymamış yağ asitlerinin serbest radikaller ile oksidasyonu lipid peroksidasyonu olarak tanımlanır. Lipid peroksidasyonu, organizmada oluşan kuvvetli yükseltgen bir radikalın etkisiyle membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asidi zincirindeki alfa metilen gruplarından bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması ile başlamaktadır. Biyolojik sistemlerde bu radikalın süperoksit ile hidroksil radikalının olduğu kabul edilmektedir. Yağ asidi, zincirinden bir hidrojen atomunun uzaklaştırılması sonucu zincir radikal niteliğini kazanır. Bunun sonucunda oluşan radikal alkil radikali olup dayanıksız bir türedir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Özellikle molekül içi çift bağ aktarılması ile dien konjugatları ve daha sonra lipid



radikalinin moleküler oksijenle etkileşimi sonucunda lipid peroksi radikali (LOO) oluşur. Lipid peroksi radikali zar yapısındaki diğer çoklu doymamış yağ asitlerini etkileyerek hidroperoksit (ROOH) ve yeni bir alkil radikali oluşturur. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroksiperoksitlerinin aldehit ve diğer karbonil bileşikleri ile etkileşmesi sonucu etan, pentan gibi uçucu gazlara dönüşür(28,31,35). Lipid peroksidasyonu biyolojik membranlarda akıcılığın kaybına, membran potansiyelinde azalmaya, hidrojen ve diğer iyonlara karşı geçirgenliğin artışı neticesinde hücrenin hasarına ve içeriğinin serbestleşmesine neden olur. Ek olarak lipid peroksidasyonunun son ürünlerinden biri olan malondialdehit (MDA) membran bileşenlerinin polimerizasyonuna ve çapraz bağ yapmalarına yol açar. Bu da, hücre yüzeyinin durumunu, enzim aktivitesini, iyon transportunu etkileyebilir(27,35).

b-)Protein oksidasyonu: Serbest radikaller ile oluşan protein oksidasyonunun kimyasal sonucu olarak metionin sulfokside, histidin oksihistidine veya asparagine, tirozin ditirozine ve sistein disülfidlere dönüşür. Bu değişiklikler proteinlerin bağlanma özelliklerinde ve enzim aktivitelerinde farklılaşmaya neden olarak hücre fonksiyonlarında bozulmalara yol açabilir(27,35).

c-) DNA: Serbest oksijen radikalleri adenin ve pirimidin nükleotid durumlarının sürdürülebilmesi için gerekli yollara engel olabilirler. Serbest oksijen radikalleri DNA ile tepkimeye girerek mutajenik olan 8-Hidroksiguanin'in ortaya çıkmasına neden olurlar(40,41).

d-) Kovalen bağlanma: Serbest radikaller polisiklik hidrokarbonlar, aromatik aminler ve nitrozaminler gibi ksenobiyotiklerin çeşitli biyomoleküllere kovalen bağlanmasına neden olabilir. Bu da doğrudan hücre hasarına yol açabilir(41).

e-) Kalsiyum: Hücre yaralanması ile ilgili olduğu düşünülen bir elementtir. Kalsiyumun transportunu engelleyen herhangi bir durum hücre fonksiyonlarını olumsuz etkiler. Kalsiyum ATPaz enzimleri önemli sulfidril gruplarına sahiptir ve serbest oksijen radikalleri (SOR) tarafından inaktive edilebilir. Sitokinler, hipoksi, endotoksin gibi faktörler SOR aracılı yol kullanarak, hücre enerjisini azaltabilirler(42).

#### 2.4.4. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada devamlı olarak serbest oksijen radikalleri oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile oksidasyon arasındaki dinamik dengeden dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değişmesi durumunda oksidatif hasar gelişebilmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarlanmasını inhibe eden pek çok endojen mekanizma bulunmakla beraber, ekzojen olarak da hasarlanmayı engelleyebilen bir çok ilaç tanımlanmıştır. Etki mekanizmaları farklı olan ekzojen ve endojen ajanlar şunlardır:

Antioksidan enzimler: Superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz bu gruptan olup primer antioksidanlardır. Serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek veya başka moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler(27,35).

Serbest radikal toplayıcılar: Vitamin E, vitamin C, karoten, ürik asit, bilirubin, albumin bu gruptandır ve sekonder antioksidanlar olarak bilinir. Bunlar serbest radikalleri yakalayarak oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engeller(35,40).

Nötrofil inhibitörleri: PAF antagonistleri ve 5-lipooksijenaz inhibitörleri kemotaksisi inhibe ederken Transforming Growth Faktör ise nötrofillerin endotele yapışmasını ve adozin reseptör mekanizması yoluyla aktive nötrofillerden serbest radikal üretimini inhibe eder(43).

Serbest radikal üretimi inhibitörleri: Allopurinol ve desferroksamin bu gruptandır.

Ekzojen antioksidanlar: Tokoferol, propranolol, kalsiyum kanal blokerleri, kaptoril bu grup ajanlardır.

## 2.5. PYCNOGENOL

Pinus pinaster olarak bilinen bir ağacın kabuğundan elde edilen flavonoid/polifenol yapısında komplekstir. Oligomerik proantosiyanidin kompleksleri denilen doğal bileşikler içerir. Pycnogenol % 70 ±5 oranında prosiyanidin içerir. Proantosiyanidin, fenolik asit, taksifolin, kateşin ve epikateşin içerir.

Pycnogenol yapılan bilimsel çalışmalar ve klinik sonuçları ile Amerikan Botanik Kurulu'nca patentli(Horphag Research, Cenova, İsviçre) ve tescilli Fransız çam tozu ekstresidir. Potansiyel olarak antiinflamatuvar ve antioksidan özelliktedir. Amerika Birleşik Devletleri'nde 30 kadar bitkisel ürün içinde yiyecek ve içecek olarak marketlerde satılmaktadır(44). Birçok çalışmada kullanılmasına rağmen potansiyel etkisi vasküler hastalıklar üzerinedir. Kontrollü klinik çalışmalarda kan dolaşımı, sirkülasyonu ve trombosit fonksiyonlarını ve venöz yetmezliği normale çevirdiği görülmüştür(45). Kontrollü klinik çalışmalarda tromboz, diyabet ve komplikasyonları, hipertansiyon, astım, hiperaktivite bozuklukları, jinekoloji ve osteoartritte etkili olduğu görülmüş(46,47,48). Ayrıca erektil disfonksiyon, retinopati, jinjivit, kramp ve kas ağrılarında etkili olduğu görülmüştür. Farmakolojik olarak insan ve hayvan modellerinde potent antioksidan ve antiinflamatuvar olduğu, trombosit agregasyonunu azalttığı, alfa glukozidaz ve kan glukoz düzeyini azalttığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı, sperm morfoloji ve fonksiyonlarını düzelttiği bildirilmiştir(49,50).

Yapılan kontrollü klinik çalışmalarda astım ve çocuklardaki dikkat eksikliğinde 1 mg/kg/gün, kolesterol/dislipidemide 120-150 mg / gün, kronik venöz yetmezlikte 150-360 mg/gün, diyabette 50-200 mg/gün, dismenorede 30-60 mg/gün, erektil disfonksiyonda 120 mg/gün , hipertansiyonda 100-200 mg/gün, osteoartritte 100-155 mg/gün , trombosit fonksiyon bozulduğunda 25-200 mg/gün, retinopatide 20-160 mg/gün dozunda kullanılması önerilmiştir. Pycnegenol'ün kontraendike olduğu bir durum yoktur. Gebelikte ilk trimester boyunca kullanımı önerilmemiştir. Gebelikte mutajen, teratojen ve toksik etkilerine rastlanmamıştır(44).

### Antioksidan-Antiinflamatuvar Aktivite

Yapılan birçok klinik çalışmada Pycnogenolün potansiyel antioksidan olduğu görülmüştür. Pycnogenolün hidroksil radikallerini ve süperoksit anyonlarını azalttığı(51). C vitamini ve diğer antioksidan enzimlerin (süperoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz) yaşam süresini arttırdığı görülmüştür(52). Lipit, protein ve DNA oksidatif hasarda hedef hücredir. Pycnogenol kullanılması ile bu hasarın önlendiği görülmüştür. Reaktif Oksijen ürünleri direk hücre hasarına neden olur ve aynı zamanda da proinflamatuvar nükleer faktör kappa aktivasyonuna neden olur. Pycnogenol makrofajlardaki nükleer faktör kappa aktivasyonunu bloke eder ve IL 1 salınımı inhibe eder.(30) Pycnogenol etkisi ile vasküler hücre adezyon molekülü(VCAM 1) ve intersellüler adezyon molekülü (ICAM 1) inhibe olur(53). Pycnogenol ile human keratonsitlerinde Calgranülin A ve B genlerinde aktivasyon olduğunu göstermiştir(54). Diğer bir çalışmada da Pycnogenolün IFN gama düzeyini azalttığı gösterilmiştir(55). Reaktif oksijen ürünleri matriks metaloproteinazları ile ilişkilidir. Metalloproteinaz 1 ve 9 artritte artar ve romatolojik hastalıkta kırıkarak deformasyonuna neden olur. Pulmoner fibroziste Metalloproteinaz 2 artışı vardır. Pycnogenol makrofajlardan metalloproteinaz 1-2 ve 9 salınımını azaltır ve bunların etkisini azaltır(56) Pycnogenol proinflamatuvar sitokin olan IL 1 ‘in salınımını inhibe eder(57). İnflamasyonda nitrik oksit sentaz düzeyinin arttığı ve nitrik oksit düzeyinin arttığı, Pycnogenol ile bu etkinin azaldığı görülmüştür(58).

### Kardiyovasküler Etkisi

Kardiyovasküler hastalıklarda damar endotelinde hasar mevcuttur. Pycnogenolün endotel hücrelerini oksidatif hasardan koruduğu görülmüştür. İntresellüler glutatyon peroksidaz, disülfid redüktaz, SOD ve katalazın aktivitesini arttırarak serbest oksijen radikallerinden korumuştur(59). Pycnogenolün mikrosirkülasyon ve trombosit fonksiyonu üzerine etkileri araştırılmış. Kontrol grubuna göre trombosit agregasyonun belirgin azaldığı bulunmuştur(60). Plazma lipit seviyeleri üzerine yapılan çalışmalarda da LDL kolesterolün %7 oranında azaldığı, HDL kolesterolün % 11 oranında arttığı; total kolesterol ve trigliserit düzeyine etkisinin olmadığı görülmüştür(61).

### Diyabet ve Komplasyonları

Tip 2 diyabetlilerde artan alfa glukozidaz enziminin Pycnogenol etkisi ile azaldığı ve kan glukoz düzeyini düşürdüğü görülmüştür(62). Diyabetik ratlarda verilen Pycnogenolün retinopati ve katarakt riskini azalttığı görülmüştür(63).

### Dikkat Eksikliği Sendromu

Dikkat Eksikliği Sendromu olan çocukların adrenalin ve noradrenalin düzeylerinin diğer çocuklara göre yüksek olduğu, dopamin seviyelerinde ise fark olmadığı görülmüştür. Tedaviye Pycnogenol eklenen çocuklarda hiperaktivite bozukluğunun azaldığı ve oksidatif stresin azaldığı görülmüştür(64).

### Üreme

Reaktif oksijen ürünlerinin sperm yapısını da bozduğu düşünülerek çalışma yapılmıştır. Pycnogenol etkisi ile sperm morfolojisinde % 38 , mannoz reseptörlerinde %19 artış görülmüştür. Total sperm sayısında değişiklik olmamıştır. Sonuçta Pycnogenolün erkeklerdeki fertilitiyi arttırabileceği görülmüştür(65).

### Gebelik ve Emzirme

Toksikolojik çalışmalarda mutajen, teratojen ve perinatal toksisite bulguları görülmemiş fakat genel yaklaşım olarak gebeliğin ilk trimestirinde kullanılmaması önerilmiştir. Fertiliteye negatif etkileri görülmemiştir(66).

### İnsanlarda Güvenli Kullanım

Pycnogenol ile yapılan klinik çalışmalarda toksik ve mutajen bulgular olmadığı için kullanılabilir. En sık görülen yan etkiler gastrointestinal sistem üzerinedir. Baş dönmesi, baş ağrısı ve bulantı diğerlerine göre daha sık görülmüştür(67). 2002-2005 yılları arasında Avrupa ve Asya'da 6 vaka sunumu yapılmış; 3 kişide ürtiker, 1 başağrısı, 1 bulantı, 1 vakada da ekzama ve diare rapor edilmiştir(68). Diğer ilaçlarla herhangi bir etkileşim rapor edilmemiştir(69).

## Pycnogenol ile Yapılan Klinik Çalışmalar

Arcangeli ve arkadaşlarının 2000'de yaptığı çalışmada, verilen 2 aylık Pycnogenol tedavisi sonrası ağrı, sıkıntı ve terlemenin belirgin azaldığı görülmüştür(70). Koch ve arkadaşlarının 2002'de yaptığı çalışmada, 4 haftalık takip sonucu Pycnogenolün belirgin şekilde ağrı ve kramp ve ödemi azalttığı görülmüştür. Kan lipit düzeyine bakıldığında da total kolesterol % 19, LDL kolesterol % 13 azalmış; HDL kolesterol düzeyinde değişiklik olmamıştır(71). Peng ve arkadaşlarının 2002'de yaptığı çalışmada, nöron apoptozisinin Alzheimer Hastalığına neden olduğu ve tedaviye Pycnogenol eklenmesi sonrası nöron apoptozisinin azalarak nöronları koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir(72). Cesarone ve arkadaşlarının 2006'da yaptığı çalışmada kronik venöz yetmezlik ve komplikasyonları araştırılmıştır. Pycnogenol ile %64 azaldığı, daflon ile %32 azaldığı görülmüştür. Takip kısa süreli olduğu için mikroanjyopati karşılaştırılmamıştır(73). Young-Su Yang ve arkadaşlarının 2007'de yaptığı çalışmada, karbon tetra klorürün hepatotoksisiteye neden olduğu ve tedaviye Pycnogenol eklenmesinin akut hepatotoksisiteyi azalttığı ve antioksidan özelliği ile lipit peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir(74). Şehirli ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı çalışmada, Pycnogenolün renal iskemi reperfüzyon sonrası koruyuculuğu araştırılmıştır. Sonuçta doku GSH ve Na-K ATPaz aktivitesinde belirgin azalma, böbrek MDA ve MPO düzeylerinde artış görülmüştür. Serum kreatinin, BUN , LDH , IL1 ve IL6 düzeylerinde gerileme görülmüştür. Araştırma sonucunda Pycnogenolün serbest radikalleri azalttığı, doku nötrofil infiltrasyonunu azalttığı ve böbrek üzerine koruyucu etkisi olduğu görülmüştür(75). Peng ve arkadaşları 2012'de Pycnogenolü Gut artrit tedavisinde kullanmışlar. Tedavi sonrası antiinflamatuvar ve antioksidan etkisi ile eklem inflamasyonu azalmıştır(76).

## Pycnogenol ile İlgili Deneysel Çalışmalar

Blazso ve arkadaşlarının 2004'de yaptığı çalışmada, Pycnogenolün yara iyileşmesi ve skar üzerine etkisi araştırılmıştır. Ratların 15 cm<sup>2</sup> yüzey alanına %1, %2 ve %5 oranında Pycnogenol içeren jel formları günde 2 kez sürülmüş. Ratlar ortalama 15 gün takip edilmiş. Araştırma sonucunda konsantasyon arttıkça yara iyileşme zamanı ve skar çapında azalma olduğu görülmüştür. Sonuçta Pycnogenolün minör cerrahilerde potansiyel olarak etkili olduğu görülmüştür(77).

Mochizuki ve arkadaşlarının 2004'de yaptığı çalışmada, ratlarda Pycnogenolün inflamatuvar barsak hastalığındaki etkisi araştırılmıştır. Ratlara 10 gün gavaj ile Pycnogenol verilmiş. Çalışma sonucunda makroskopik tahribatın daha az olduğu, MPO aktivitelerini doza bağımlı olarak azalttığı görülmüştür. Sonuçta oral Pycnogenol eklenmesinin inflamatuvar barsak hastalığını azalttığı görülmüştür(78).

Ramos ve arkadaşlarının 2006'da yaptığı çalışmada, Pycnogenolün X ray ışınlarına maruz kalan barsak mukozasına etkisi araştırılmıştır. Ratlar 15 Gy x ışınlarına maruz bırakılmış ve oral olarak 150- 200 MG / kg oranında Pycnogenol rejimlerine eklenmiştir. Çalışma sonucunda Pycnogenolün, barsak mukozasındaki iyonize radyasyonun etkisinin belirgin olarak azalttığı görülmüştür(79).

Nocun ve arkadaşlarının 2007'de yaptığı çalışmada, Pycnogenolün kardiyovasküler hastalıklarda koruyucu etkisinin bilindiğini fakat antitrombotik etkisinin bilinmediği söylenmiştir. Diyabetik ratlarda tedaviye eklenen Pycnogenolün yalnız veya antiplatelet tedaviye ek olarak verilmesinin tromboksan miktarını azalttığı görülmüştür(80).

Jankyova ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı çalışmada, Pycnogenolün diyabetik ratlardaki glukoz düzeyleri ve motor sinir iletim hızları araştırılmıştır. Ratlar streptozosin tedavisi sonrası diyabetik hale getirilmiş. Daha sonra 8 hafta 10- 50 mg/ kg arasında farklı dozlarda tedaviye Pycnogenol eklenmiştir. Sonuçta postprandial kan glukoz düzeylerinin belirgin azaldığı ve dozdan bağımsız olarak motor sinir iletim hızında etkin olduğu görülmüştür(81).

Hasegawa ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı çalışmada, ratlara orşiektomi uygulanmış ve 1,5 ay ile 3 ay arasında testesteron seviyelerinin düştüğü görülmüştür. Beyin diseksiyonları yapılarak hipokampus ve korteks bölümleri tanımlanmış. Tedaviye Pycnogenol eklenen ratların hipokampus ve korteks bölgesinde sinir büyüme faktörlerinin (NGF) arttığı ve hafıza bozukluğunu

geliştirdiği görülmüştür(81). Kolacek ve arkadaşlarının 2010'da yaptığı çalışmada diyabetik ratlarının beyinlerinde bakır-çinko(Cu-Zn) SOD sentezinin belirgin olarak azaldığı görülmüştür. Diyabetik ratlara eklenen Pycnogenolün Cu-Zn SOD miktarlarında artış görülmüştür(82). Aydın ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı çalışmada, sisplatin toksisitesi sonrası ratlara 5 gün boyunca Pycnogenol ( 200 mg / kg oral) verilmiştir. Böbrek ve kırmızı kan hücrelerinde antioksidatif parametreler ölçülmüş. Kemik iliğindeki kromozom anomalileri ve böbrek histopatolojileri değerlendirilmiştir. Sisplatin tedavisi sonrası oksidan enzimlerin belirgin arttığı, antioksidan enzimlerin belirgin azaldığı görülmüştür. Tedavilerine önceden Pycnogenol eklenen ratların parametrelerin normale yakın olduğu görülmüştür. Kromozom hatalarının azaldığı ve mitotik indekslerinin arttığı görülmüştür(83). Sung Hwan Kim ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada, ratlara siklofosfamid verdikten sonra Pycnogenol ekleyerek toksisiteden koruma amaçlanmıştır. Pycnogenolün lipit peroksidasyon engellenmesi ve anti oksidan aktivitesini arttırması ile embriyo-fetüs toksisitesinden koruduğu görülmüştür(84). Parveen ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada, diyabetik ratlarda Pycnogenol kullanımı sonrası karaciğer ve pankreas dokusundan örnek ve kan numuneleri çalışılmıştır. Ratların glukoz ve Hgb A1c değerlerinin arttığı fakat amilaz, insülin ve hepatik glikojen düzeylerinin diyabetik grupta azaldığı, Pycnogenol kullanan grupta ise etkilerinin azaldığı görülmüştür. Ayrıca glutatyon ve katalaz aktivitelerini azalttığı görülmüş. Sonuçta Pycnogenol kullanımının diyabet komplikasyonlarını azalttığı görülmüştür(85). Mei ve arkadaşlarının 2012'de yaptığı çalışmada 6 hafta süresince ratlara yağ oranı yüksek diyet verilmiştir. Ratlara da 5 hafta boyunca rejimlerine Pycnogenol (10 mg / kg oral) eklenmiştir. Pycnogenol verilen grupta trigliserit ve ALT düzeylerinin belirgin olarak azaldığı görülmüştür. Bu çalışma sonucunda rejime oral Pycnogenol eklenmesinin karaciğere koruyucu etkisi olduğu görülmüştür(86).



### III. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi'nin desteği ile deneysel çalışma olarak gerçekleştirildi. Çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu'nun onayı alındıktan sonra Afyon Kocatepe Üniversitesi Deney Hayvanları Uygulama ve Araştırma Merkezi Laboratuvarında yapılmıştır.

#### 3.1. KULLANILAN DENEKLER VE BAKIMI

Bu deneysel çalışma Afyon Kocatepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümü Laboratuvarında, Kocatepe Üniversitesi Hayvan Etik Kurulu onayı ile gerçekleştirildi. Çalışma, Süleyman Demirel Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Cerrahi ve Araştırma Bölümüne bağlı hayvan üretim merkezinden temin edilen ağırlıkları 250-300 gr arasında değişen 40 adet erkek Wistar Albino cinsi ratlarla gerçekleştirilmiştir. Deney öncesi ve sonrasında ratlar müstakil eşit büyüklükteki kafeslerde, 20-24 °C sıcaklığındaki oda ısısında, standart yem ve çeşme suyu ile ad libitum beslenmeye alındı ve 12 saat gece 12 saat gün ışığı alabilen laboratuvar ortamında himaye edildi.

#### 3.2. DENEY PROTOKOLU

##### 3.2.1. Çalışma grupları

Çalışma ratlarda arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde gerçekleştirildi. Ratlar her grupta 10 rat olmak üzere rastgele 4 gruba ayrıldı.

Grup 1 de (n:10) sağ arka bacak kompozit ada flebi modeli oluşturulduktan sonra ratların arka bacaklarında femoral damarlara klemp uygulanıp önce ven sonra arter klemleri hemen açıldı ve iskemi oluşturulmadı.

Grup 2 de (n:10) arka bacak kompozit ada flebi modeli oluşturulduktan sonra ratların arka bacaklarında femoral arter ve vene 4 saat mikro damar klemleri (Acland klemleri) uygulanarak iskemi uygulandı. 4 saat sonra klemler önce ven klembi olmak üzere ardışık olarak açılarak 24 saat reperfüzyon yapıldı.

Grup 3 de arka bacak kompozit ada flebi modeli oluşturulduktan sonra ratların arka bacaklarında femoral arter ve vene 4 saat mikro damar klempleri (Acland) kullanılarak iskemi uygulandı. 4 saat sonra klempler önce ven klembi olmak üzere ardışık olarak açılarak reperfüzyona başlandı. Reperfüzyon başlangıcında ratlara serum fizyolojik (%0.9 NaCl) 10 cc/kg olmak üzere intraperitoneal olarak verildi.

Grup 4 de arka bacak kompozit ada flebi modeli oluşturulduktan sonra ratların arka bacaklarında femoral arter ve vene 4 saat mikro damar klempleri (Acland) kullanılarak iskemi uygulandı. 4 saat sonra klempler önce ven klembi olmak üzere ardışık olarak açılarak reperfüzyona başlandı. Reperfüzyon başlangıcında ratlara daha önce 1000 cc distile su içerisine 10 mg pycnogenol ( Horphag, İsviçre), konularak hazırlanan çözeltiden 0.1 mg/kg (10 cc/kg) olmak üzere intraperitoneal olarak verildi.

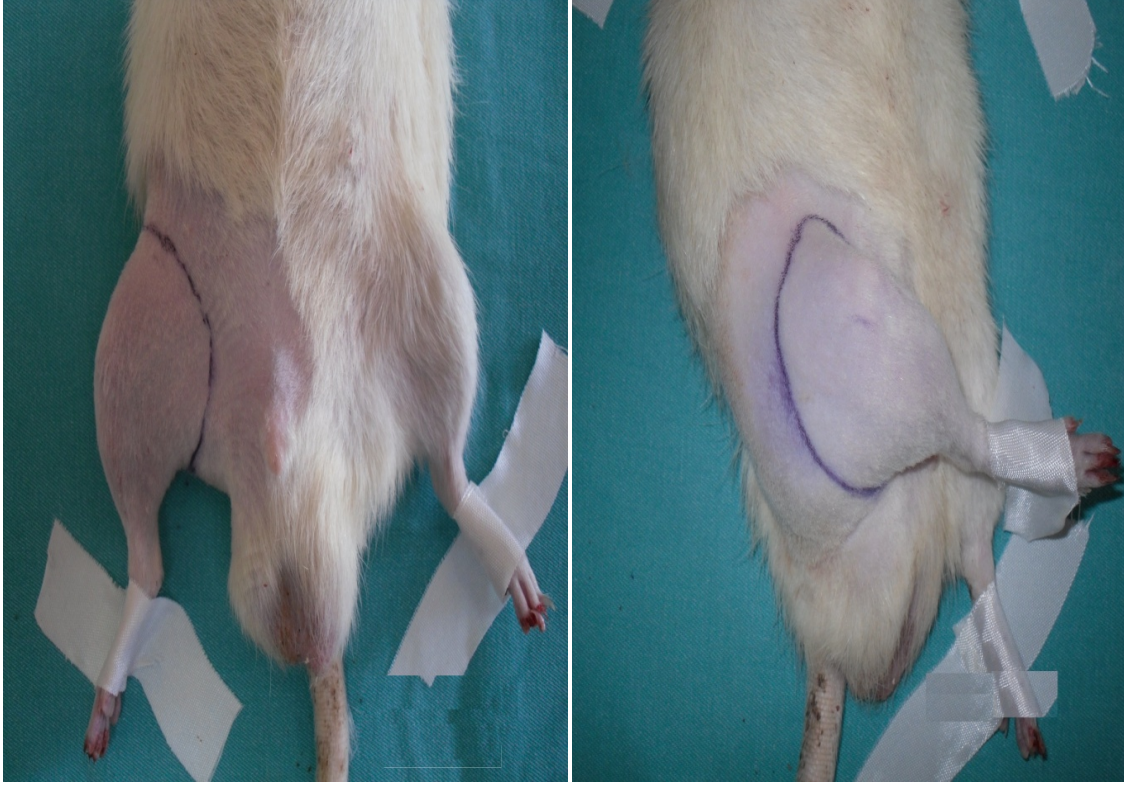
#### Cerrahi teknik

Girişim öncesi deney hayvanlarına anestezi ajan olarak intramüsküler Ketamin 100 mg/kg (Ketalar amp, EIP, İstanbul, Türkiye) ile Xylazine 60 mg/kg (Bayer, İstanbul, Türkiye) uygulandı. Ağrılı uyarana yanıt alınmayınca cerrahi işleme başlandı.

Ratlar supin pozisyonunda yatırıldıktan sonra her iki ön ve arka bacakları sabitlendi. Sağ arka bacakta operasyon alanı traş edildi ve alanda %10'luk Betadin ile antisepsi sağlandı. Sağ inguinal bölgeden yapılan sirküler insizyon ile cilt-cilt altı doku geçildi. Femoral arter ve ven loope ile büyütme altında (6X) uygun diseksiyonlar ile diseke edilerek korundu. Kas yapıları sirküler olarak insize edildikten sonra femur orta hattından osteotomi yapılarak arka bacak femoral arter ve ven bazlı kompozit ada flebi olarak hazırlandı(28).

### Reperfüzyon evresi

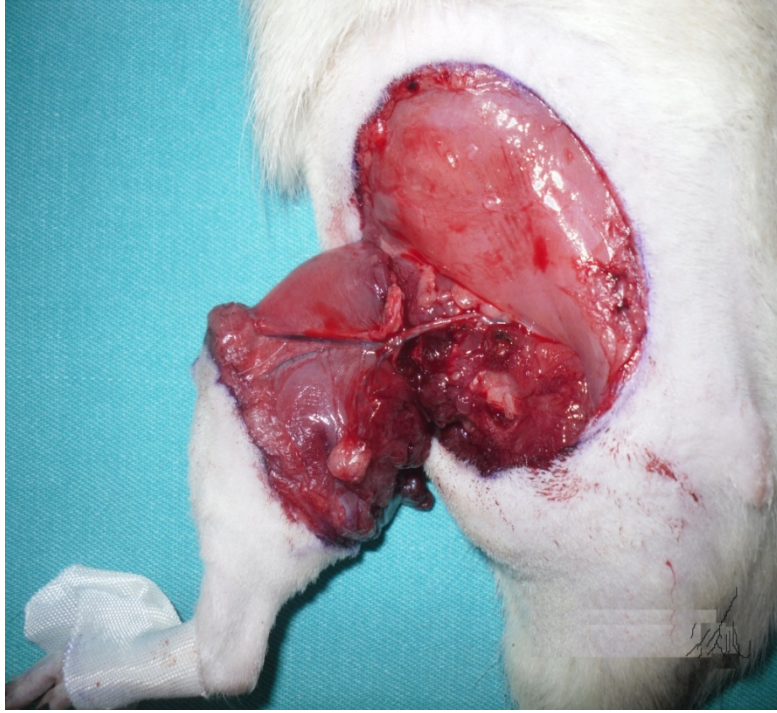
Ratlar 4 saatlik iskemi süresince uyutuldu ve yakın gözlem yapıldı. Tüm ratlar cerrahi işlem sonrası uyandırıldı ve kafeslerinde uygun bakım koşullarında 24 saat süre ile izlendiler. 24 saatlik reperfüzyon sonrası tüm ratlar sakrifiye edildi.



**Şekil 8:** Ratların sağ arka bacaklarının preoperatif çizimi



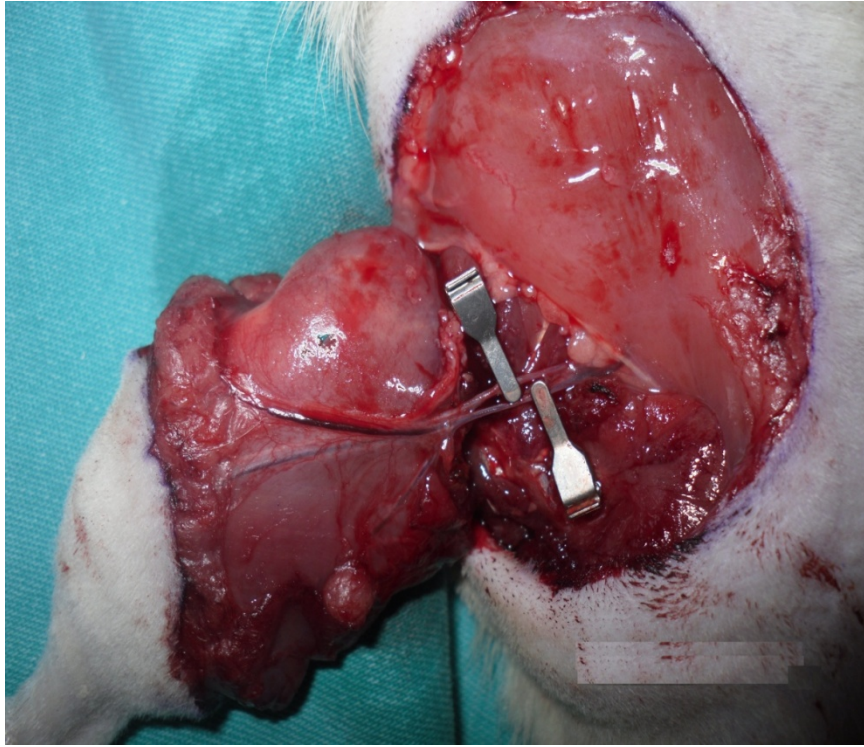
**Şekil 9:** Cilt insizyonu yapılarak femoral arter ve venin ortaya konması



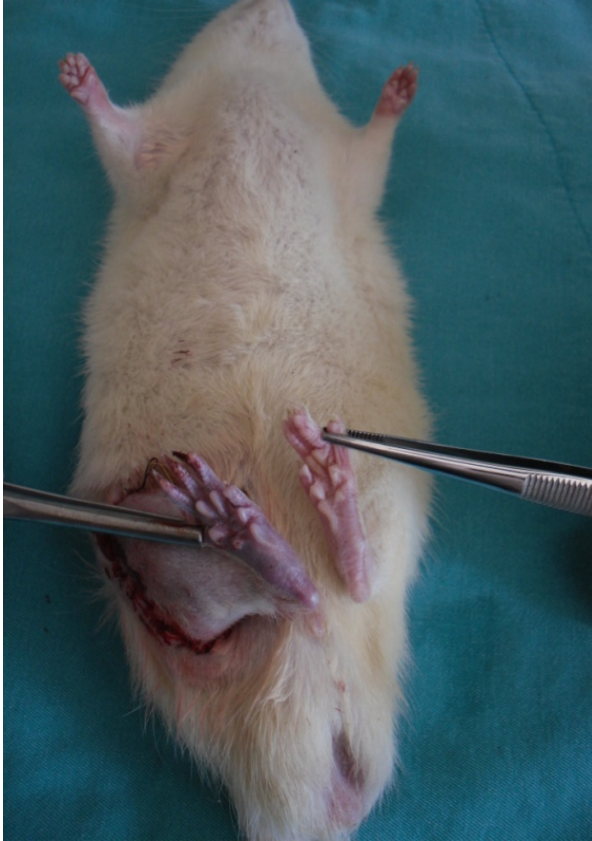
**Şekil 10:** Yumuşak dokuların femoral arter ve ven korunarak sirküler olarak femura kadar insize edilmesi



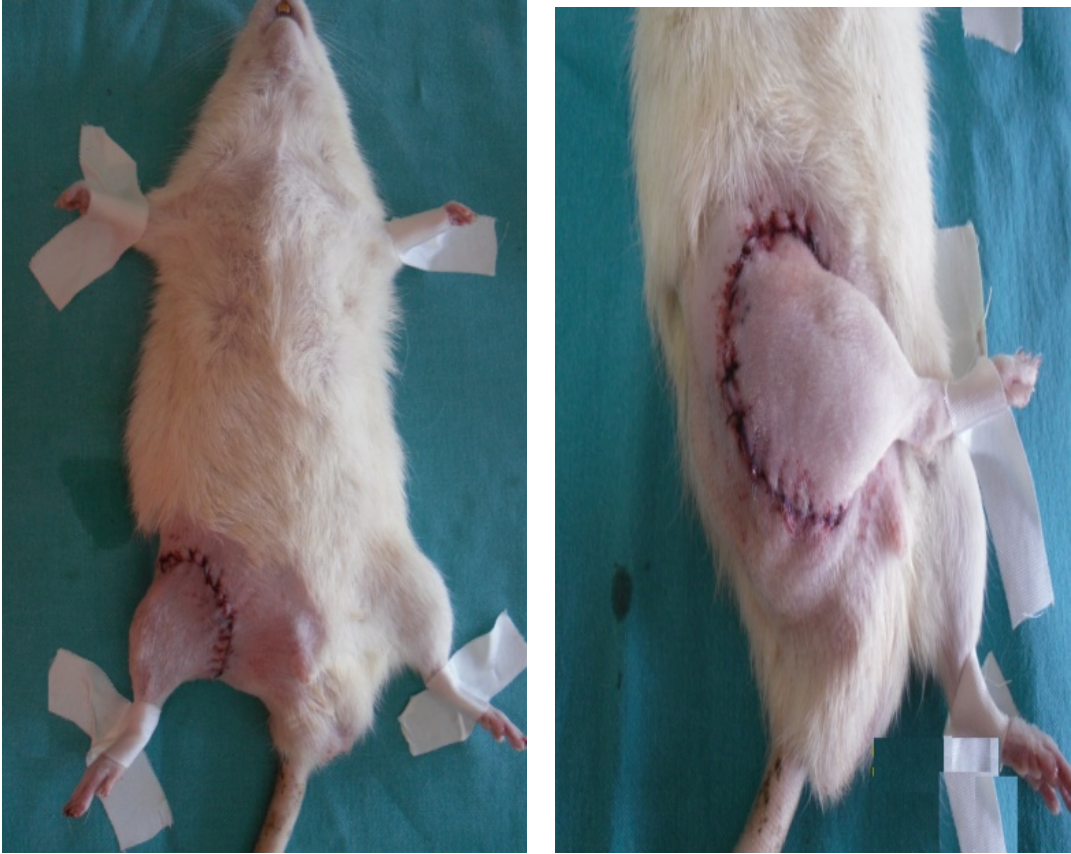
**Şekil 11:** Femur osteotomisi sonrası rat arka bacak kompozit ada flebinin oluşturulması



**Şekil 12:** Femoral arter ve venin klemplenmesi ve iskemi oluşturulması



**Şekil 13:** Ratlarda iskemi sonrası( 4. Saatte ) makroskopik görünüm



**Şekil 14:** Arka bacak kompozit ada flebinin yerine suture edilmesi



**Şekil 15:** Reperfüzyon başlangıcında ratların arka bacak kompozit flebinin makroskobik görünümü



**Şekil 16:** 24 saatlik reperfüzyon sonrası sakrifiye edilmeden hemen öncesinde arka bacağın makroskobik görünümü.



### 3.2.2. Deney aşamasının sonlandırılması

Cerrahi sonrası hayvanlarda kompozit flep takibi yapıldı. Ratlar digital fotoğraf makinesi (Samsung ES 90) ile fotoğraflandı. Ratlar 24. saatte sakrifiye edildikten sonra biyokimyasal incelemeler için doku ve kan örnekleri alındı.

## 3.3. DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ

### 3.3.1 Biyokimyasal değerlendirme

#### Doku ve kan örnekleri

Tüm ratlar 24 saatlik reperfüzyon sonrası sakrifiye edildi. Ratlardan biyokimyasal inceleme amaçlı intrakardiyak olarak kan örnekleri ve lokal doku hasarını göstermek için arka bacadan gastrokinemius kası total olarak alındı. Doku örnekleri soğuk serum fizyolojik ile yıkayıp -20 ° C'de bekletildi. Uygun tampon ile homojenize edildi. Homojenize tamponun santrifüjü sonrasında süpernatant kısmından dokusunda MPO, Glutasyon, MDA, TNF-alfa, IL-2 ve IL-10 düzeyleri elisa yöntemi ile çalışıldı. Ayrıca ratlardan alınan kanlarda MPO, MDA, TNF-alfa, IL-2 ve IL-10 düzeyleri ve eritrositte Glutasyon düzeyleri çalışıldı.



**Şekil 17:** Kas biyopsilerinin gastrokinemus kasından alınması (ok ile işaretli)

### 3.3.2. İstatistiksel değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi “SPSS 18.0 Windows” (SPSS Inc., Chicago, Illinois, ABD) yazılımı kullanılarak yapılmıştır. Verilerin normal dağılıma uygunluğu Shapiro-Wilk testi ile değerlendirildi ve normal değerler tek yönlü varyans analizi Anova testi ile değerlendirildi, normal olmayan değerler Kruskal Vallis testi ile değerlendirildi. Farklı olan grubun belirlenmesinde Tukey testi kullanıldı. Verilerin değerlendirilmesinde tanımlayıcı istatistiksel metotlar kullanılmış; ortalama±standart sapma, ortalama, minimum ve maksimum değerler, değer sayısı ve yüzde olarak ifade edilmiştir. Gruplar arası karşılaştırmalarda p değerinin  $<0.05$  olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edilmiştir.

## IV. BULGULAR

### 4.1.MAKROSKOBİK BULGULAR

Tüm ratlarda 24 saatlik izlem sonrası arka bacak kompozit fleplerinde %100 sağkalım izlendi.

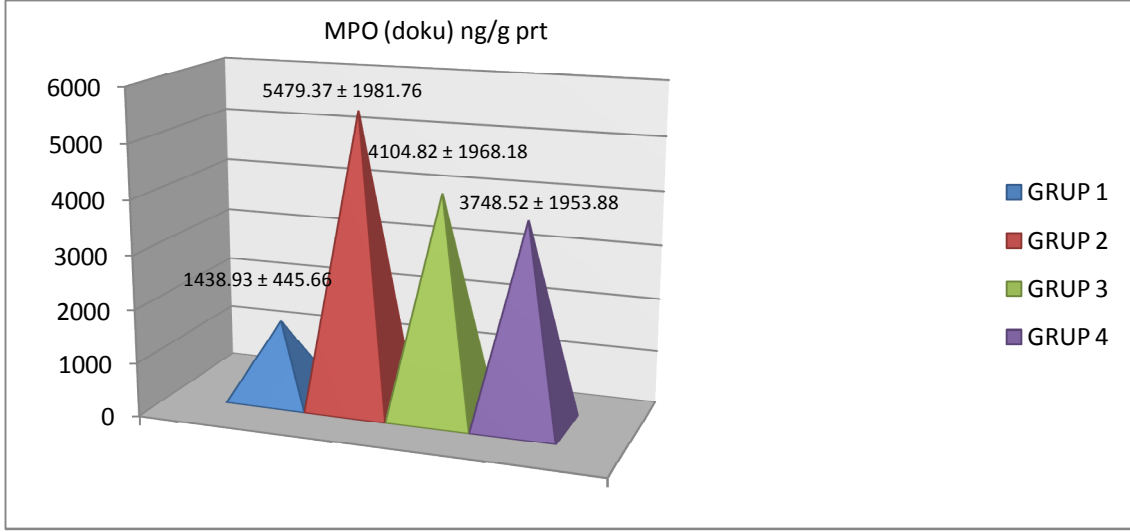
### 4.2. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Gruplara ait doku ve serum MPO, MDA, GSH, TNF alfa, IL- 2 ve IL-10 düzeyleri tablo üzerinde gösterilmiştir(Tablo2-7).

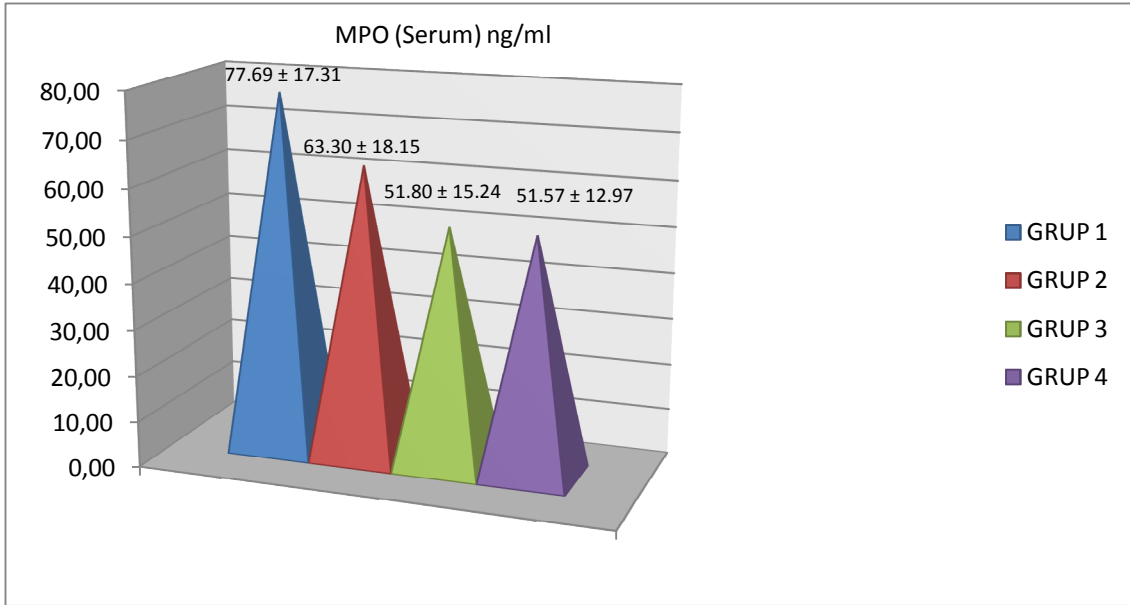
Çalışmamızda doku MPO düzeyleri Grup 1 de  $1438.93 \pm 445.66$  ng/g prt , Grup 2 de  $5479.37 \pm 1981.76$  ng/g prt, Grup 3 de  $4104.82 \pm 1968.18$  ng/g prt ve grup 4 de  $3748.52 \pm 1953.88$  ng/g prt idi. Gruplar arasında anlamlı bir fark görülmedi ( $p > 0.05$ ). Serum MPO düzeyleri Grup 1 de  $77.69 \pm 17.31$  ng/ml, Grup 2 de  $63.30 \pm 18.15$  ng/ml, grup 3 de  $51.80 \pm 15.24$  ng/ml ve grup 4 de  $51.57 \pm 12.97$  ng/ml idi. Serum MPO düzeyi Grup 3 ve 4 te, Grup 2 ye göre anlamlı olarak düşüktü ( $p < 0.05$ ).

**Tablo II:** Doku ve serum MPO düzeyleri

Gruplar	Doku MPO düzeyi (ng/g prt)	Serum MPO düzeyi (ng/ml)
1	$1438.93 \pm 445.66$	$77.69 \pm 17.31$
2	$5479.37 \pm 1981.76$	$63.30 \pm 18.15$
3	$4104.82 \pm 1968.18$	$51.80 \pm 15.24$
4	$3748.52 \pm 1953.88$	$51.57 \pm 12.97$



**Şekil 18** : Doku MPO düzeyleri

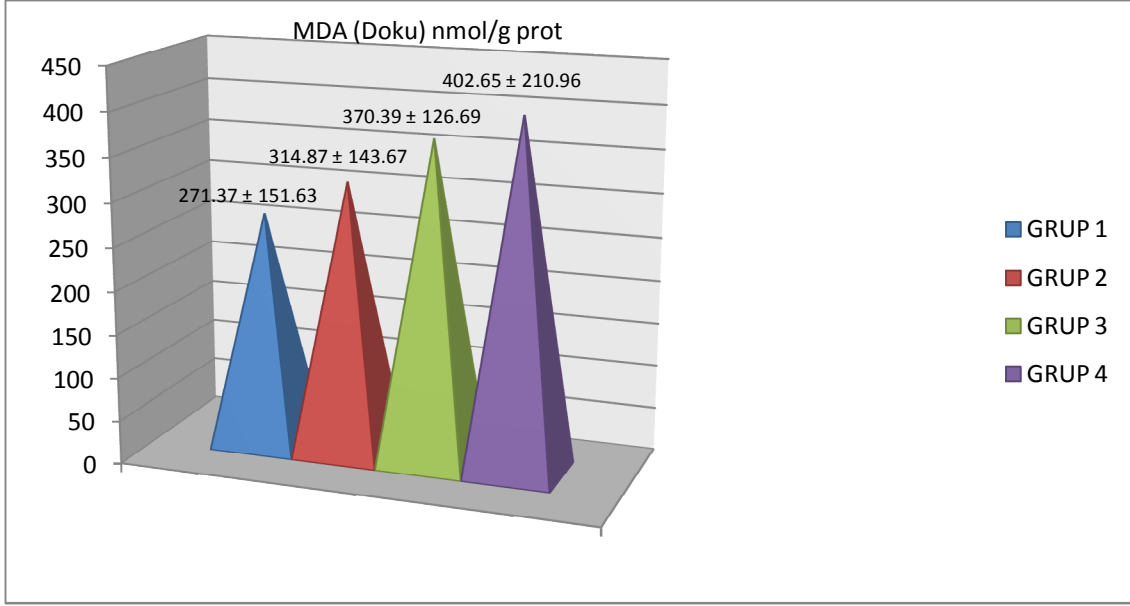


**Şekil 19** :Serum MPO düzeyleri

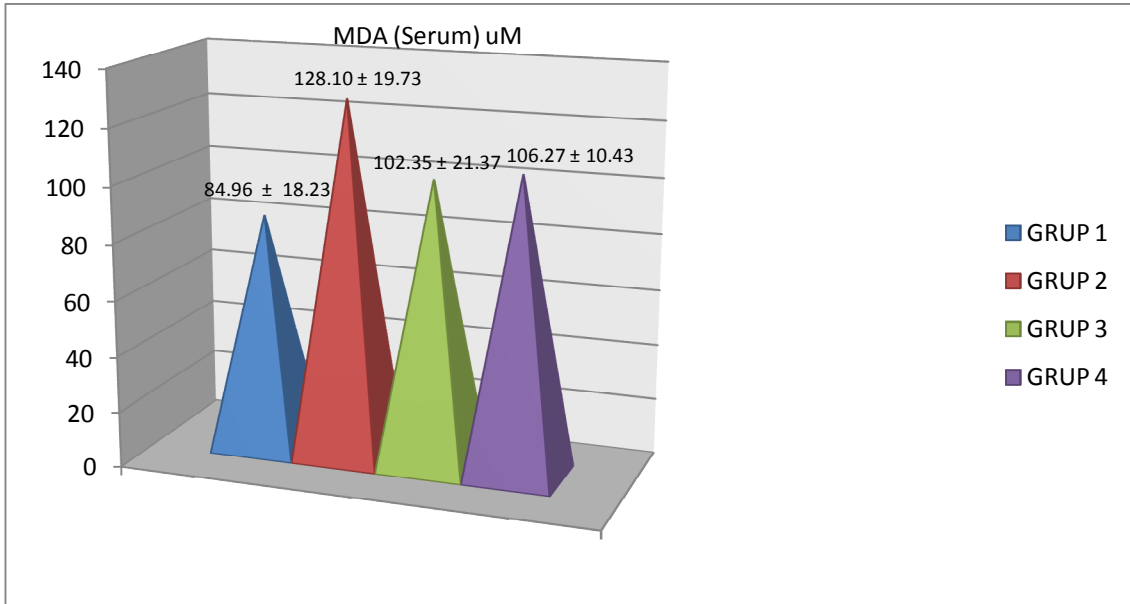
Doku MDA düzeyleri Grup 1 de  $271.37 \pm 151.63$  nmol/g prot, Grup 2 de  $314.87 \pm 143.67$  nmol/g prot, Grup 3 de  $370.39 \pm 126.69$  nmol/g prot, ve Grup 4 de  $402.65 \pm 210.96$  nmol/g prot idi. Gruplar arasında ( $p > 0.05$ ) bir fark görülmedi. Serum MDA düzeyleri Grup 1 de  $84.96 \pm 18.23$  uM , Grup 2 de  $128.10 \pm 19.73$  uM, Grup 3 de  $102.35 \pm 21.37$  uM ve Grup 4 de  $106.27 \pm 10.43$  uM idi. Grup 4 te MDA değeri Grup 2 ye göre anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ ).

**Tablo III:** Doku ve serum MDA düzeyleri

Gruplar	Doku MDA düzeyleri (nmol/g prot)	Serum MDA düzeyleri (uM)
1	$271.37 \pm 151.63$	$84.96 \pm 18.23$
2	$314.87 \pm 143.67$	$128.10 \pm 19.73$
3	$370.39 \pm 126.69$	$102.35 \pm 21.37$
4	$402.65 \pm 210.96$	$106.27 \pm 10.43$



Şekil 20 : Doku MDA düzeyleri

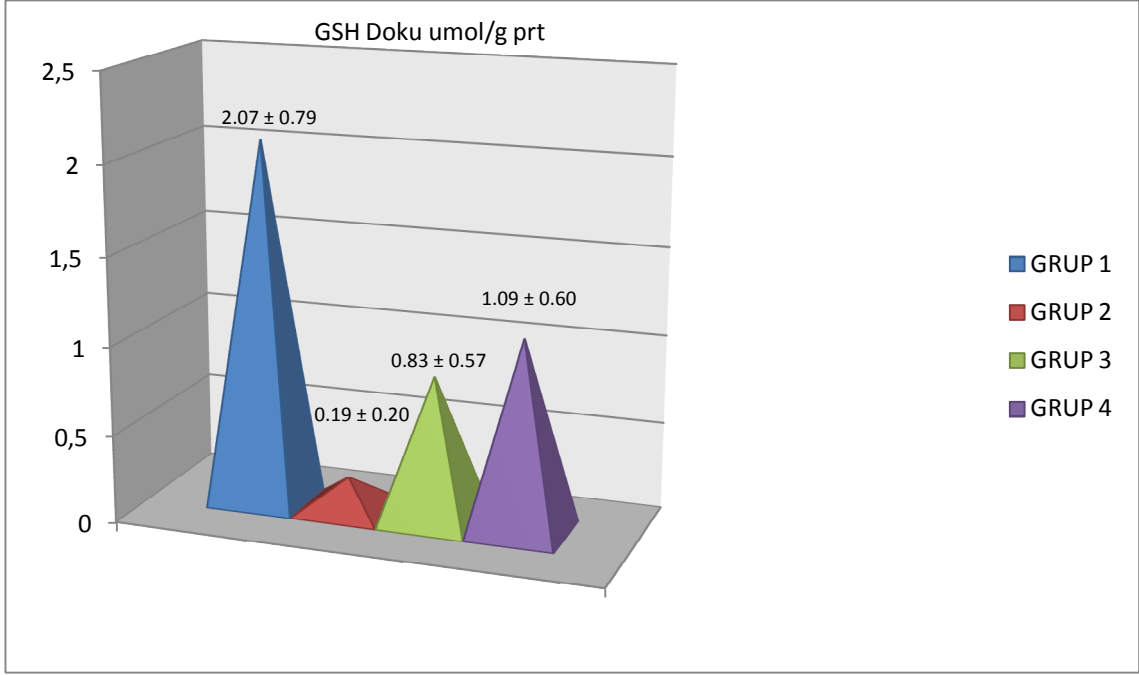


Şekil 21 : Serum MDA düzeyleri

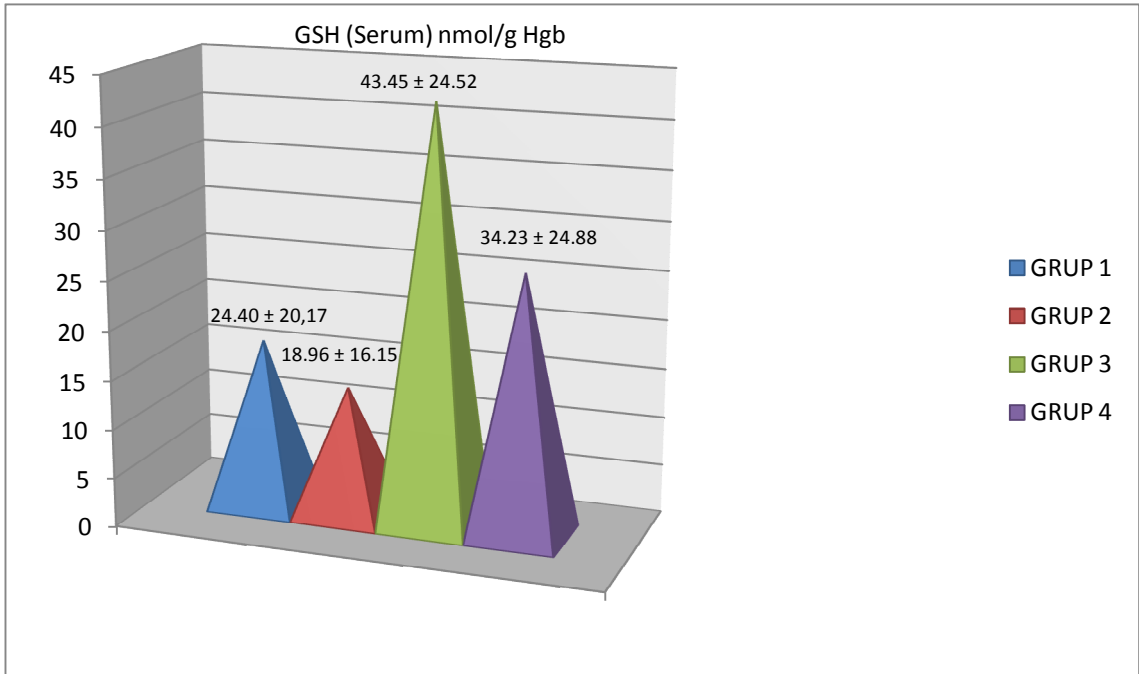
Doku GSH düzeyleri Grup 1 de  $2.07 \pm 0.79$  umol/g prt , Grup 2 de  $0.19 \pm 0.20$  umol/g prt , Grup 3 de  $0.83 \pm 0.57$  umol/g prt ve Grup 4 de  $1.09 \pm 0.60$  umol/g prt idi. Gruplar arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.05$ ) Çalışmamızda GSH (eritrosit) nmol/g Hgb düzeyleri Grup 1 de  $24.40 \pm 20.17$  ,Grup 2 de  $18.96 \pm 16.15$ , Grup 3 de  $43.45 \pm 24.52$  ve Grup 4 de  $34.23 \pm 24.88$  idi. Gruplar arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.05$ )

**Tablo IV:** Doku ve serum GSH düzeyleri

Gruplar	Doku GSH düzeyleri (umol/g prt)	Serum GSH düzeyleri(nmol/g Hgb)
1	$2.07 \pm 0.79$	$24.40 \pm 20.17$
2	$0.19 \pm 0.20$	$18.96 \pm 16.15$
3	$0.83 \pm 0.57$	$43.45 \pm 24.52$
4	$1.09 \pm 0.60$	$34.23 \pm 24.88$



**Şekil 22:** Doku GSH düzeyleri



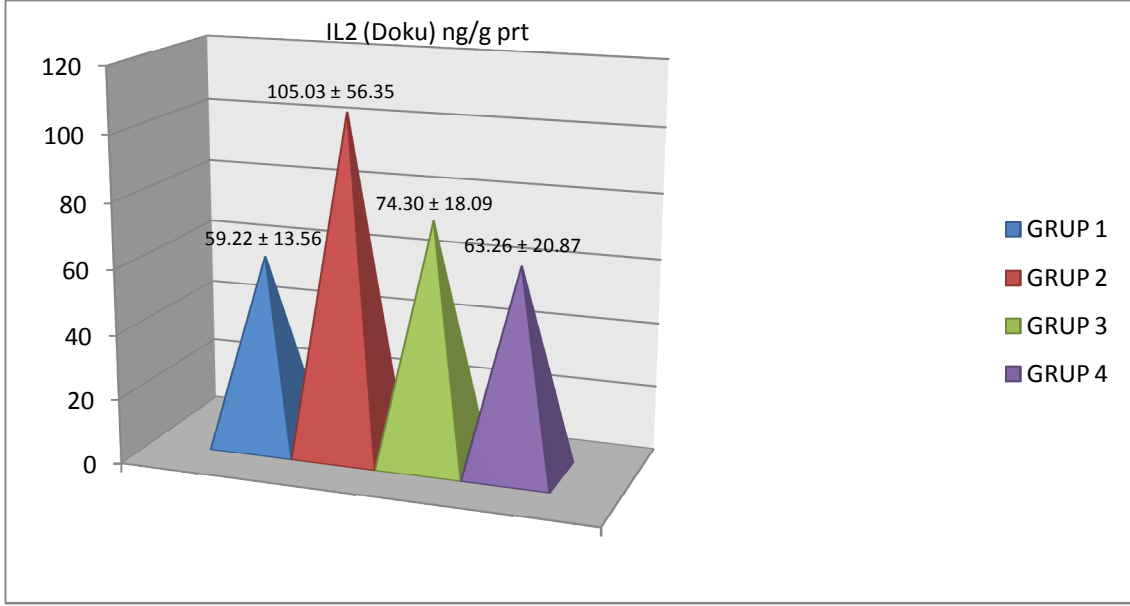
**Şekil 23 :** Serum GSH düzeyleri



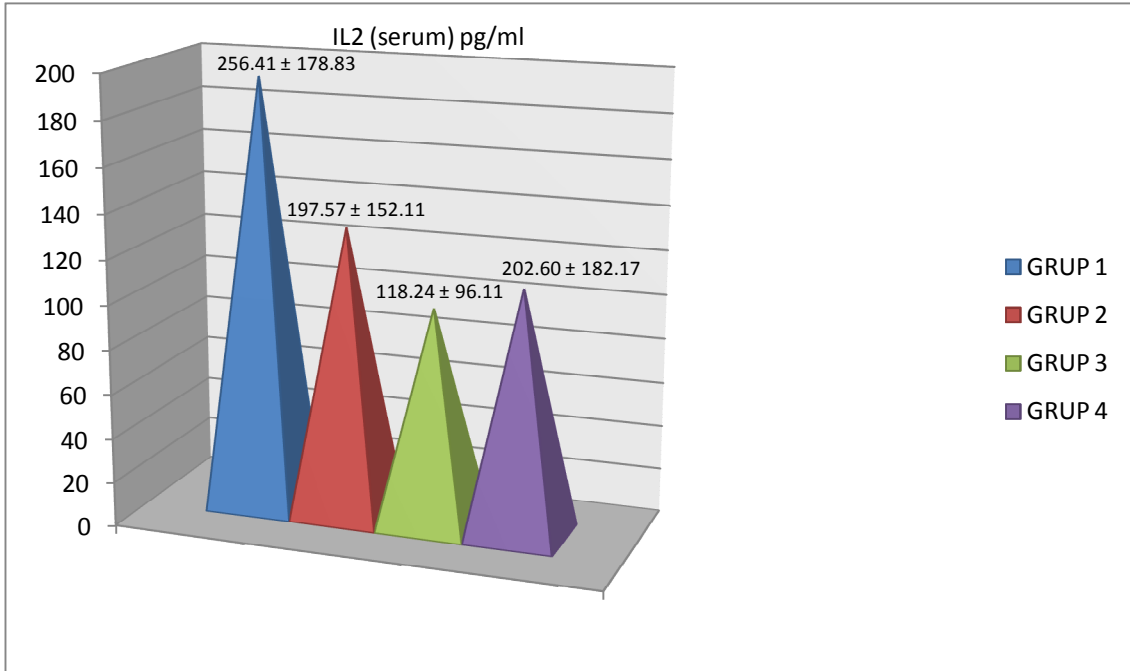
Doku IL2 ng/g prt düzeyleri Grup 1 de  $59.22 \pm 13.56$  ng/g prt, Grup 2 de  $105.03 \pm 56.35$  ng/g prt, Grup 3 de  $74.30 \pm 18.09$  ng/g prt ve Grup 4 de  $63.26 \pm 20.87$  ng/g prt idi. Grup 4 te IL2 değeri Grup 2 ye göre anlamlı derecede düşüktü( $p < 0.05$ ) Grup 1 ile arasında anlamlı bir fark yoktu. Serum IL2 düzeyleri Grup 1 de  $256.41 \pm 178.83$  pg/ml ,Grup 2 de  $197.57 \pm 152.11$  pg/ml, Grup 3 de  $118.24 \pm 96.11$  pg/ml ve Grup 4 de  $202.60 \pm 182.17$  pg/ml idi. Gruplar arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.05$ )

**Tablo V: Doku ve serum IL2 düzeyleri**

Gruplar	Doku IL2 düzeyleri (ng/g prt)	Serum IL2 düzeyleri (pg/ml)
1	$59.22 \pm 13.56$	$256.41 \pm 178.83$
2	$105.03 \pm 56.35$	$197.57 \pm 152.11$
3	$74.30 \pm 18.09$	$118.24 \pm 96.11$
4	$63.26 \pm 20.87$	$202.60 \pm 182.17$



Şekil 24: Doku IL2 düzeyleri

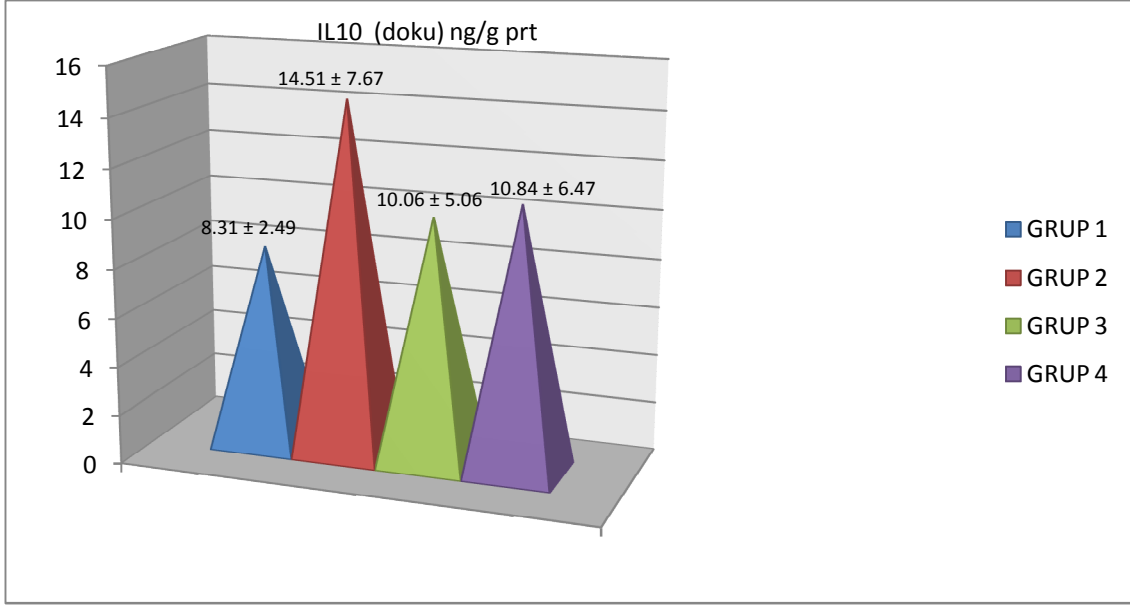


Şekil 25 : Serum IL2 düzeyleri

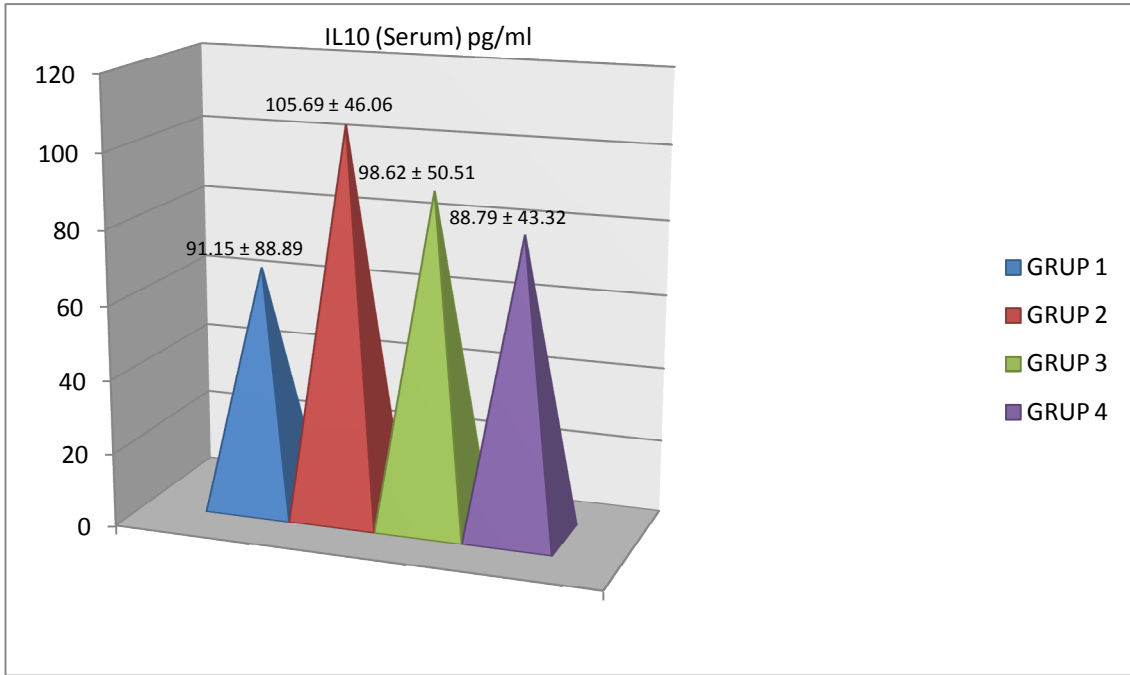
Doku IL10 düzeyleri Grup 1 de  $8.31 \pm 2.49$  ng/g prt, Grup 2 de  $14.51 \pm 7.67$  ng/g prt, Grup 3 de  $10.06 \pm 5.06$  ng/g prt ve Grup 4 de  $10.84 \pm 6.47$  ng/g prt idi. Gruplar arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.05$ ) Serum IL10 pg/ml düzeyleri Grup 1 de  $91.15 \pm 88.89$  pg/ml, Grup 2 de  $105.69 \pm 46.06$  pg/ml, Grup 3 de  $98.62 \pm 50.51$  pg/ml ve Grup 4 de  $88.79 \pm 43.32$  pg/ml idi. Gruplar arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.05$ )

**Tablo VI :** Doku ve serum IL10 düzeyleri

Gruplar	Doku IL10 düzeyleri (ng/g prt)	Serum IL10 düzeyleri (pg/ml)
1	$8.31 \pm 2.49$	$91.15 \pm 88.89$
2	$14.51 \pm 7.67$	$105.69 \pm 46.06$
3	$10.06 \pm 5.06$	$98.62 \pm 50.51$
4	$10.84 \pm 6.47$	$88.79 \pm 43.32$



Şekil 26: Doku IL10 düzeyleri

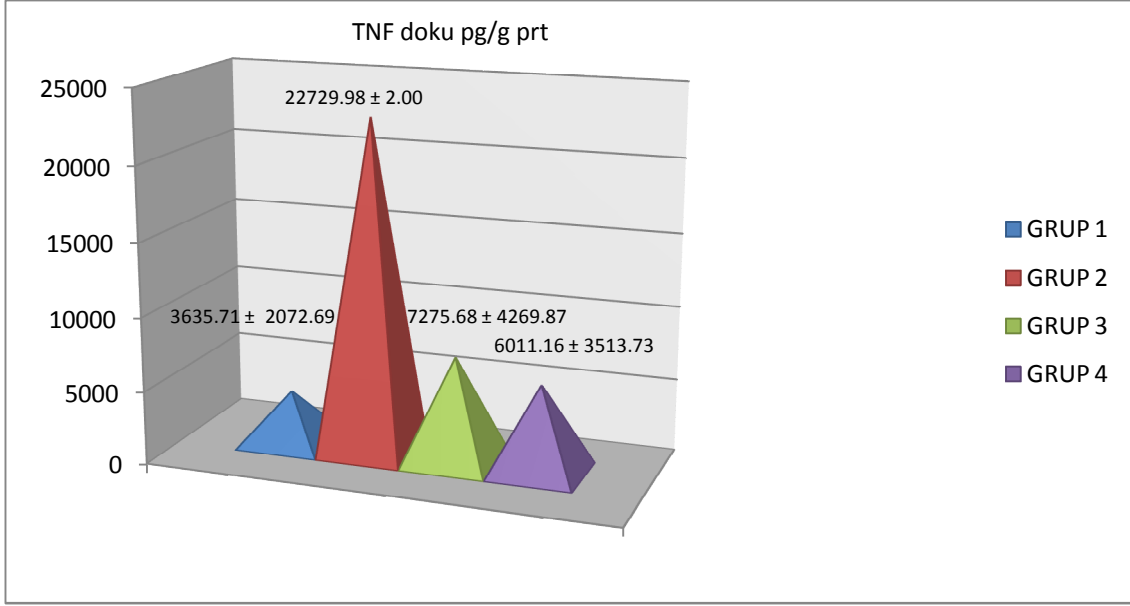


Şekil 27 : Serum IL10 düzeyleri

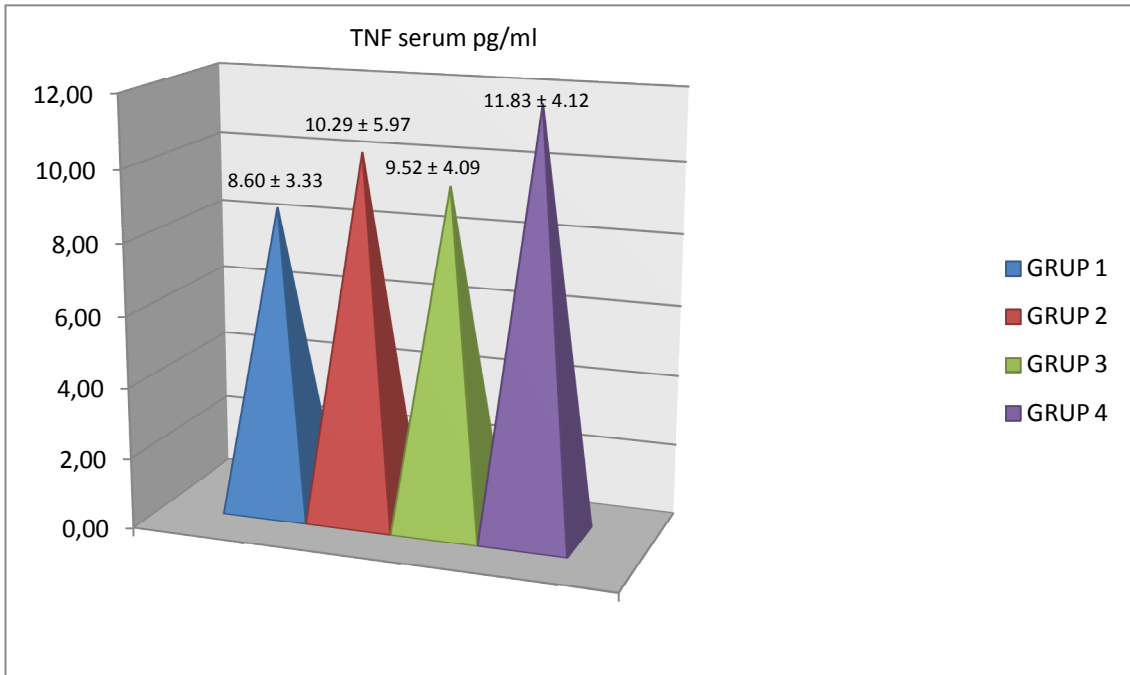
Doku TNF düzeyleri Grup 1 de  $3635.71 \pm 2072.69$  pg/g prt, Grup 2 de  $22729.98 \pm 2.00$  pg/g prt, Grup 3 de  $7275.68 \pm 4269.87$  pg/g prt, ve Grup 4 de  $6011.16 \pm 3513.73$  pg/g prt idi. Grup 4 te TNF seviyesi Grup 2 ye göre anlamlı derecede düşüktü ( $p < 0.05$ ) Serum TNF serum düzeyleri Grup 1 de  $8.60 \pm 3.33$  pg/ml, Grup 2 de  $10.29 \pm 5.97$  pg/ml, Grup 3 de  $9.52 \pm 4.09$  pg/ml ve Grup 4  $11.83 \pm 4.12$  pg/ml idi. Gruplar arasında bir fark görülmedi. ( $p > 0.05$ ).

**Tablo VII :** Doku ve serum TNF düzeyleri

Gruplar	Doku TNF düzeyleri (pg/g prt)	Serum TNF düzeyleri (pg/ml)
1	$3635.71 \pm 2072.69$	$8.60 \pm 3.33$
2	$22729.98 \pm 2.00$	$10.29 \pm 5.97$
3	$7275.68 \pm 4269.87$	$9.52 \pm 4.09$
4	$6011.16 \pm 3513.73$	$11.83 \pm 4.12$



**Şekil 28 : Doku TNF düzeyleri**



**Şekil 29 : Serum TNF düzeyleri**

## V. TARTIŞMA

Rekonstrüktif Cerrahi’de gelişen tekniklere bağlı olarak doku defektlerinin onarımında oldukça başarılı sonuçlar elde edilebilmesine karşın, çok geniş defektlerinin onarımında halen çeşitli güçlüklerle karşılaşılabilir. Onarımda çok değişik yöntemler kullanılmakla beraber en iyi fonksiyonel ve estetik sonuçlar sıklıkla flep transferleriyle mümkün olmaktadır. 20. Yüzyılın sonlarına doğru mikrocerrahi alanındaki gelişmelerle çok daha sıklıkla yapılmaya başlanılan serbest doku aktarımları ile geniş doku defektlerinin onarımında çok iyi sonuçlar elde edilmeye başlanmıştır. Fakat halen distal nekroz ve bazı vakalarda uzamış iskemiye bağlı iskemi reperfüzyon hasarı önümüzde sorun olarak durmaktadır. İskemi-reperfüzyon hasarı klinikte özellikle tromboz, emboli, bypass cerrahisi, organ transplantasyonu, turnike uygulamaları, replantasyon ve mikrovasküler serbest doku aktarımı gibi durumlarda görülebilmektedir.

Vücutta herhangi dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi kimyasal olay gerçekleşir. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girerek laktik asit ve toksik metabolitleri birikir. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (27,28,30). Hücresel homeostaz için gerekli olan enerji kaynaklarının, özellikle ATP’nin tüketimi, hücre membranında iyon dengesizliğine yol açar. Na<sup>+</sup> ve Ca<sup>++</sup> iyon dengesi bozulur. Bunu asidoz ve ozmotik şok gibi klinik bulgular ile kromatin kümelenmesi ve piknozis gibi histolojik bulgular takip eder (3,27,28)

Reperfüzyon, iskemiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden sağlanması aşamasıdır. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Bunun yanında oksijenden zengin kanın iskemik dokuya dönüşü uzamış iskemiye maruz kalmış dokularda dokuyu daha da fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır (28,31,32). Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda dokuda iskemi-reperfüzyon hasarı mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Dokularda oluşan serbest radikallerin uzaklaştırılması için

organizmaların temel antioksidan sistemleri mevcuttur. Bu sistemlerin en önemli enzimlerinden birisi SOD ve GSH-Px'dir. Serbest radikallerin özellikle de superoksit radikalinin ortamdan uzaklaştırılması reperfüzyon hasarının zararlı etkilerinin oluşmasını engellemede önemlidir. GSH-Px, substratı olan GSH'ı kullanarak oksijen radikallerini zararsız hale getirir. Yine SOD enzimi de superoksit radikalini zararsız bileşiklere indirgeyerek bu radikalın zararlı etkisini ortadan kaldırır. Serbest radikallerin en önemli etkilerinden biri hücre zarı lipitlerinin peroksidasyonuna ve bozulmasına neden olarak hücre zarına hasar vermesidir(87,88,89).

İskemi-reperfüzyon hasarını önlemek için şu ana kadar çok sayıda deneysel çalışma yapılmıştır. İskemik dokuya reperfüzyon anında normalin çok üstünde bir kan akışı olduğu gözlenmiştir(90). "No-reflow fenomeni" denen dolaşımın durmasıyla karakterize total hasarın oluşmasında iskemik dokuya reperfüzyon anında gelen kanın miktarının etkili olabileceği düşüncesiyle akımın regülasyonu konusunda çeşitli çalışmalar yapılmıştır. Ünal ve arkadaşlarının 2001'de yaptığı çalışmada, kademeli olarak arttırılan kan akımının iskemi-reperfüzyon hasarına olan etkisi araştırılmıştır(91). Bizim çalışmamızda da kullanılan modelde femoral damarlara klemp konularak 4 saatlik iskemi yaratılarak sonrasında reperfüzyon için klemp önce ven sonra arter olacak şekilde kademeli olarak açılmıştır. Bu şekilde distal parçaya giden kan akım miktarı normal düzeylerde tutulmaya çalışılarak iskemik hasar ölçülmüştür. Yapılan doku çalışmalarında kademeli olarak reperfüzyon yapılan grupta iskemik doku hasarının belirgin derecede azaldığı saptanmıştır(91). Özmen ve arkadaşlarının rat kremaster mikrosirkülasyon modelinde yaptığı çalışmada iskemi sonrası akut ve kademeli olarak yapılan reperfüzyon sonrası hasar değerlendirilmiştir. Akut olarak klempin gevşetilmesinin % 600 oranında kan hızını arttırdığı; rolling, adhezyon ve transmigrasyon yapan lökosit sayısının arttığı ve daha fazla doku hasarına neden olduğu görülmüştür(90). İskemik reperfüzyon hasarında ortam ısısının etkisi ile ilgili de çalışmalar yapılmıştır. Gürke ve arkadaşlarının 2000'de yaptığı çalışmada, farklı sıcaklıkta (22°C, 30°C, 35°C) kas iskemi-reperfüzyon hasarları ölçülmüştür ve hafif hipotermide iskemi-reperfüzyon hasarının daha az olduğu görülmüştür(92). Demir ve arkadaşlarının



2001'de yaptığı çalışmada, farklı sıcak iskemii sürelerinde aksiyel paternli ada fleplerin neovaskularizasyonları değerlendirilmiştir. Süperfisial arter bazı adipomuskulokutanöz flep tasarlanmış ve 90 ve 180 dakika iskemii süreleri oluşturulmuştur. Uzun iskemii süresi sonrası neovaskularizasyonun daha çok olduğu görülmüştür. Otörler artan iskemii süreleri sonrası dokuda oluşan iskemik hasarın neovaskularizasyonu arttığını belirtmişlerdir(93). Kim ve arkadaşlarının 2009'da yaptığı çalışmada, rat arka bacak kısmına turnike uygulaması ile iskemii-reperfüzyon sonrası kas tahribatı non invazif olarak kızılötesi spektroskopii ile değerlendirilmiştir. 2 ile 3 saat süresince 250 mmHg basınç uygulaması sonrası doku oksihemoglobin ve deoksihemoglobin değerleri ölçülmüştür. Hemodinamik değerlerin 2 ile 3 saat arasında belirgin bozulduğu görülmüştür. Sonuçta klinik olarak turnike uygulaması sonrası non invazif olarak doku monitorizasyonu yapılabileceği ve kritik durumlarda sonlandırılabilceği belirtilmiştir(94). Loerakker ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı çalışmada, uzamış kas hasarında deformasyon, iskemii ve reperfüzyonun rolünü değerlendirmişler ve değerlendirme sonucunda her birinin ayrı etkilerinin olduğu görülmüştür(95). Loerakker ve arkadaşlarının 2011'de yaptığı diğeri bir çalışmada, ratlara 4 saat iskemii ve sonrasında 2 saatlik reperfüzyon yapılmış ve kastaki iskemii reperfüzyon hasarı T2 ve dinamik kontrastlı MR ile değerlendirilmiştir. Sonuçta uzamış iskemii sonrası reperfüzyonun doku hasarını arttırdığı ve bununla bası yaralarına neden olduğu iddia edilmiştir(96).

Organizmanın normal işleyişinde devamlı olarak serbest oksijen radikalleri oluşmasına rağmen antioksidan savunma sistemleri ile dinamik denge sağlanır ve bundan dolayı zararlı etkiler ortaya çıkmaz. Fizyolojik veya patolojik olaylar sonucu bu dengenin oksidasyon lehine değışmesi durumunda oksidatif hasar gelişmektedir. İskemii-reperfüzyon hasarını inhibe eden pek çok endojen mekanizma bulunmakla beraber, ekzojen olarak da bu hasarı engelleyebilen bir çok ilaç tanımlanmıştır. Superoksit dismutaz, glutatyon peroksidaz, katalaz primer antioksidan enzimlerdir. Serbest radikalleri, biyolojik önemi olan moleküllerle etkileşmeden önce daha zararsız bileşiklere dönüştürerek veya başka moleküllerden radikal üretimini engelleyerek etkilerini gösterirler(35). Vitamin E, vitamin C, karoten, ürik asit, bilirubin ve albumin serbest radikalleri yakalayarak

oluşabilecek zincir reaksiyonlarını engellerler(35,40). PAF antagonistleri ve 5-lipooksijenaz inhibitörleri kemotaksisi inhibe ederken Transforming Growth Faktor ise nötrofillerin endotele yapışmasını ve adenzin reseptör mekanizması yoluyla aktive nötrofillerden serbest radikal üretimini inhibe ederler(43). Allopurinol ve desferroksamin, serbest radikal üretimini inhibe ederek etki gösterirler. Tokoferol, propranolol, kalsiyum kanal blokerleri ve kaptoril ise ekzojen antioksidanlardır.

Yapılan birçok deneysel çalışmada çeşitli ajanlar kullanılarak iskemi-reperfüzyonun hasarının önüne geçilmeye çalışılmıştır. Çalışmamızda kullandığımız Pycnogenol farklı etki mekanizmalarının test edilmesi amacıyla son 40 yıldır çok fazla çalışılmakta olan bir ajandır ve 2008 yılından beri de bitkisel diyetlerin içine dahil edilmiştir. Potansiyel olarak anti-inflamatuar ve antioksidan özellik taşıdığı bilinmektedir. Birçok çalışmada kullanılmasına rağmen en sıklıkla vasküler bozukluklar üzerine etkisi çalışılmıştır. Kontrollü klinik çalışmalarda kan dolaşımı, sirkülasyonu ve trombosit fonksiyonlarını ve venöz yetmezliği normale çevirdiği görülmüştür(45). Yine yapılan klinik çalışmalarda tromboz, diyabet komplikasyonları, hipertansiyon, astım, hiperaktivite bozuklukları, jinekoloji ve osteoartritte etkili olduğu görülmüştür(46,47,48). Ayrıca erektil disfonksiyon, retinopati, jinjivit, kramp ve kas ağrılarında etkili olduğu da görülmüştür. Farmakolojik olarak insan ve hayvan modellerinde potent antioksidan ve antiinflamatuar olduğu, trombosit agregasyonunu azalttığı, alfa glukozidaz ve kan glukoz düzeyini azalttığı, yara iyileşmesini hızlandırdığı, sperm morfoloji ve fonksiyonlarını düzelttiği yapılan bir çok çalışmada bildirilmiştir(49,50).

Pycnogenolün etkinliği bir çok deneysel modellerde de araştırılmıştır. Hayvan modelinde Pycnogenolün yara iyileşmesi ve skar üzerine etkisi araştırılmış ve konsantasyon arttıkça yara iyileşme zamanı ve skar çapında azalma olduğu görülmüştür(77). Mochizuki ve arkadaşlarının 2004'de yaptığı çalışmada, ratlarda Pycnogenolün inflammatuar barsak hastalığındaki etkisi araştırılmış ve Pycnogenol verilen ratlarda makroskopik tahribatın daha az olduğu, MPO aktivitelerini doza bağımlı olarak azalttığı görülmüştür. Sonuçta oral Pycnogenol eklenmesinin inflammatuar barsak hastalığını azalttığı görülmüştür(78). Yakın zamanda yapılan başka bir çalışmada Pycnogenolün X ray ışınlarına maruz kalan

barsak mukozasındaki iyonize radyasyanın etkisinin belirgin olarak azalttığı görülmüştür(79). Young-Su Yang ve arkadaşlarının 2007’de yaptığı çalışmada, karbon tetraklorürün hepatotoksisiteye neden olduğu ve tedaviye Pycnogenol eklenmesinin akut hepatotoksisiteyi azalttığı ve antioksidan özelliği ile lipid peroksidasyonunu azalttığı gösterilmiştir(74). Jankyova ve arkadaşlarının 2009’da yaptığı çalışmada, Pycnogenolün diyabetik ratlardaki glukoz düzeyleri ve motor sinir iletim hızları üzerine etkisi araştırılmıştır. Sonuçta postprandial kan glukoz düzeylerinin belirgin azaldığı ve dozdan bağımsız olarak motor sinir iletim hızında etkin olduğu görülmüştür(81). Şehirli ve arkadaşlarının 2009’da yaptığı çalışmada, Pycnogenolün renal iskemi-reperfüzyon modelinde koruyuculuğu araştırılmıştır. Araştırma sonucunda Pycnogenolün serbest radikalleri azalttığı, doku nötrofil infiltrasyonunu azalttığı ve böbrek üzerine koruyucu etkisi olduğu görülmüştür(75). Antioksidan etkinliğin gösterilmesi amaçlı yapılan başka bir çalışmada, sisplatin toksisitesi sonrası ratlara 5 gün boyunca Pycnogenol ( 200 mg / kg oral) verilmiş. Böbrek ve kırmızı kan hücrelerinde antioksidatif parametreler ölçülmüş ve kemik iliğindeki kromozom anomalileri ve böbrek histopatolojileri değerlendirilmiştir. Sisplatin tedavisi sonrası oksidan enzimlerin belirgin arttığı, antioksidan enzimlerin belirgin azaldığı görülmüştür. Tedavilerine önceden Pycnogenol eklenen ratların bu parametrelerinde normale yakın düzeylere düşme olduğu görülmüştür. Ayrıca kromozom hatalarının azaldığı ve mitotik indekslerinin arttığı görülmüştür(83). Sung Hwan Kim ve arkadaşlarının 2012’de yaptığı çalışmada, ratlara siklofosfamid verdikten sonra Pycnogenolün lipid peroksidasyonunu engellediğini ve antioksidan aktivitenin artması ile embriyo ve fetüsü toksisiteden korunduğu gösterilmiştir(84).

Pycnogenolün antioksidan özelliği bir çok klinik ve deneysel çalışmalarda test edilmesine ve etkinliğinin bir çok farklı alanda gösterilmesine rağmen rekonstrüktif cerrahide kompozit flepler üzerindeki iskemi-reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi henüz çalışılmamıştır. Solid organlarda iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede faydalı olduğu görülmüştür yalnız kompozit dokular solid dokulardan bir çok yönüyle farklılık gösterdiğinden rekonstrüktif cerrahide kullanılmadan önce uygun hayvan modellerinde test edilmesi gerekmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarı plastik cerrahide özellikle major

replantasyonlar ve kompozit doku allotransplantasyonların önemli bir sorun olduğundan Pycnogenolün etkinliğinin değerlendirilmesi için çalışmamızda rat arka-bacak transplantasyon modelini tercih ettik. Pycnogenol daha önceki çalışmalarda oral olarak kullanılmıştır. Fakat iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde erken dönemde yeterli kan konsantrasyonuna erişilmesi gerektiğinden ve klinik olarak uygulanabilir bir model olması amacıyla çalışmamızda çözelti haline getirilerek parenteral yoldan hayvanlara verilmiştir. Çalışmamızda iskemi-reperfüzyon aşamasında artan serbest oksijen radikallerinin antioksidan özellikteki Pycnogenol ile azaltılıp azaltılamayacağı test edilmiştir. Reperfüzyon döneminde oluşan serbest radikal hasarının büyüklüğünü, antioksidan madde (GSH, MPO) ve inflamasyonda etkili faktör ( TNF alfa, IL 2 ve IL 10) düzeylerinin ölçümü ile göstermeyi planladık. Ayrıca reperfüzyon sonucu hücre membranı hasarı yapan lipid peroksidasyonu da MDA düzeyinin ölçümü ile gösterildi. Daha önceki iskemi-reperfüzyon çalışmalarında 2 veya 4 saat iskemi uygulanıp 12 veya 24 saatlik reperfüzyon sonrası biyokimyasal ölçümler yapılmıştır. Çalışmamızda da benzer şekilde 4 saatlik iskemi sonrası doku 24 saat reperfüze edildi. Alınan kan ve kas doku örneklerinden biyokimyasal olarak belirtilen parametreler ölçülmüştür.

Çalışmamızda Pycnogenol verilen ratlarda 24 saatlik reperfüzyon sonrası serum MDA, serum MDO, doku IL2 ve doku TNF düzeylerinde kontrol grubuna göre anlamlı derecede düşük düzeyler elde edilmiştir. Diğer parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı olmamasına rağmen herhangi bir ajan verilmeden reperfüzyon yapılan gruba göre daha düşük değerler elde edilmiştir. Çalışmamızda Pycnogenolün kompozit dokularda iskemi reperfüzyon hasarını önleyici etkisi daha önceki çalışmalarda da gösterilen antioksidan özelliğine bağlı olabilir diye düşünmekteyiz.

Çalışmamız Pycnogenolün kompozit ada flepler üzerine olan etkisini gösteren ilk çalışma olması bakımından da özellik taşımaktadır. Pycnogenolün etkinliği konusunda çok daha farklı flep modellerinde çalışmalar yapılması ve etki mekanizmalarının ortaya konması için farklı parametreler üzerine çalışılması gerekmektedir.

Pycnogenol uygulaması özel teknik ve cihaz gerektirmez, ucuz ve kolay uygulanabilir. Ek cerrahi gerektirmediğinden enfeksiyon, kanama, ağrı gibi riskleri de olmaması nedeniyle iskemi reperfüzyon hasarının önleme amacıyla klinikte ileride uygulama alanı bulabileceğini düşünmekteyiz.

## VI. SONUÇ

Bu çalışmamız sonucunda pycnogenol uygulaması sonrası flep iskemi-reperfüzyon hasarının anlamlı olarak azaldığı gösterildi. Pycnogenol toksik ve mutajen değildir ve uygulaması kolaydır. Ek cerrahi gerektirmemesi, özel teknik ve cihaz ihtiyacı olmaması nedeniyle de uygulanabilir bir yöntemdir.

Rekonstrüktif cerrahide halen ciddi bir problem olan iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde tercih edilebilir bir uygulama olduğunu düşünmekteyiz. Pycnogenolun etkisinin tam olarak anlaşılabilmesi için önceki literatür bilgileri ışığında ek çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Rekonstrüktif cerrahide değişik flep türleri üzerindeki etkisinin gösterilebilmesi için de yeni modeller üzerinde yeni çalışmalar planlanmalıdır.

## VII. ÖZET

Rekonstrüktif Cerrahide doku defektlerinin onarımı için flepler yaygın olarak kullanılmaktadır. Uzun süreli iskemi sonrası taşınan fleplerde kısmi ya da tam flep kaybı halen bir sorundur. Bu çalışmanın amacı, reperfüzyon aşamasında tedaviye eklenen pycnogenolün iskemi reperfüzyon hasarını önlemedeki etkinliğini araştırmaktır.

Çalışmada 250-300 gr ağırlığında 40 adet erkek rat kullanıldı. Hayvanlar her grupta 10 hayvan olacak şekilde, randomize 4 gruba ayrıldı. Tüm ratlarda arka bacak kompozit ada flebi hazırlandı Kontrol grubunda (n:10) ratlarda arka bacakta femoral damarlara klemp uygulanıp hemen açıldı ve iskemi oluşturulmadı. Grup 2 de (n:10) femoral artere 4 saat iskemi uygulandı ve iskemi sonrası 24 saat arka bacak reperfüze edildi. Grup 3 de (n:10) 4 saat iskemi sonrası klemler açıldı, ratlara parenteral olarak serum fizyolojik verildi ve 24 saat boyunca reperfüze edildi. Grup 4 de (n:10) 4 saatlik iskemi sonrası ratlara parenteral olarak pycnogenol verildi ve 24 saat reperfüzyon yapıldı. Tüm ratlar 24 saatlik reperfüzyon sonrası sakrifiye edildi ve biyokimyasal inceleme yapıldı. Biyokimyasal inceleme için kan örneği ve transplante edilen arka baktan kas dokusu örneği alındı. Homogenizasyon sonrası kanda ve dokularda MPO, Glutatyon, MDA, TNF-alfa, IL-2 ve IL-10 düzeyleri test edildi ve reperfüzyon hasarı değerlendirildi.

Çalışma sonunda, iskemi sonrası reperfüzyon esnasında pycnogenol eklenen grupta MPO(serum), MDA(serum), IL2 (doku), TNF(doku) değerlerinde iskemi sonrası reperfüzyon grubuna göre anlamlı farklar elde edildi.

Çalışmamızda, pycnogenol kullanımının iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede olumlu etkisinin olduğu bulundu Ancak klinik uygulama için yeni ve geniş çalışmalara ihtiyaç vardır.

## VIII. SUMMARY

### THE EFFECT OF PYCNOGENOL ON PREVENTION OF ISCHEMIA - REPERFUSION INJURY IN RAT HINDLIMB MODEL

Flaps are widely used for reconstruction of tissue defects in reconstructive surgery. Partial or total failure of flaps with long warm ischemia time is still a problem to be solved. This experimental study was performed to evaluate the effect of pycnogenol on the prevention of ischemia-reperfusion injury.

Forty male rats weighing between 250-300 grs were used in this study. The rats were divided into 4 groups randomly, 10 rats each. Hindlimb composite island flaps were raised in all rats. In group 1, clamps were applied to the femoral vessels but immediately released without creating ischemia. In group 2, 4 hours of ischemia was created and then 24 hours of reperfusion was performed. In group 3, following 4 hours of ischemia, the rats were administered saline and the flaps were reperfused for 24 hours. In group 4, following 4 hours of ischemia, pycnogenol was administered intraperitoneally and then the flaps were reperfused for 24 hours. All rats were sacrificed following 24 hours reperfusion. Blood samples and muscle tissue samples were obtained for testing MPO, Glutathion, MDA, TNF-alfa, IL-2, and IL-10 levels to evaluate reperfusion injury.

As a result, there was significant decrease in levels of serum MPO, tissue IL-2 and tissue TNF, serum MDA compared to Group 2.

In conclusion, pycnogenol was found to be effective in prevention of ischemia-reperfusion injury. Further studies are needed before clinical application of this drug.



## **IX. KAYNAKLAR**

1. Charles H Thorne. Techniques and principles in plastic surgery. In: Charles H Thorne, Scott P Bartlett, Robert W Beasley, Sherrell J Aston, Geoffrey C Gurtner. *Grabb & Smith's Plastic Surgery*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2007:03-15.
2. Meirer R, Kamelger FS, Huemer GM, Wanner S, Piza-Katzer H. Extracorporeal shock wave may enhance skin flap survival in an animal model. *The British Association of Plastic Surgeons* 2005; 58:53-57.
3. Banic A, Greulich M. Late results of breast reconstruction with free TRAM flaps: a prospective multicentric study. *Plast Reconstr Surg* 1995; 95:1195-1203.
4. Geddes CR, Morris SF, Neligan PC. Perforator flaps: evolution, classification, and applications. *Ann Plast Surg* 2003; 50(1):90-99.
5. Zhang F, Waller W, Lineaweaver WC. Growth factor and flap survival. *Microsurgery* 2004; Apr:162-167.
6. Im MJ, Su CT, Anthenelli RM. Skin-flap metabolism in rats: Oxygen consumption and lactate production. *Plast Reconstr Surg* 1983; 71:685-688.
7. Gute DG, Ishida T, Yarimizi K. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998; 179(1-2):169-187.

8. May JW, Chait LA, O'Brien JV, Hurley JV. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978; 61:256-267.
9. Mates M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. *Toxicology* 2000; 153:83-104.
10. Rugiu PS, Sykes PJ. *A History of Plastic Surgery*. Springer, 2007.
11. Mathes SJ, Hansen SL. Historical Perspectives. In: Mathes SJ, Hentz VR. *Mathes Plastic Surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006:Vol 1:27-34.
12. Lamberty BG, Cormack GC. Fasciocutaneous flaps. *Clin Plast Surg*. 1990 Oct;17(4):713-26.
13. F, Mathes SJ. Musculocutaneous flap or muscle flap and skin graft? *Ann Plast Surg*. 1984 Feb;12(2):199-203.
14. Mathes SJ, Hansen SL. Flap Physiology. In: Mathes SJ, Hentz VR. *Mathes Plastic Surgery*. Philadelphia: Saunders Elsevier, 2006:Vol 1:483-501
15. Kim KZ, Thompson DH, George TF. Effect of anemia on survival of myocutaneous flaps in the pig. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1994;111(4):509-512.
16. Byrne PJ, Goding GS. Skin Flap Physiology and Wound Healing. In: Cummings CW, Haughey BH, Thomas JR, Harker LA. *Cummings Otolaryngology: Head And Neck Surgery*. 5th Edition. Elsevier, 2007:Vol 1: 146-160.
17. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous Wound Healing. *N Engl J Med* 1999; 341:738-746.

18. Nicholas B. Vedder, MD, Flap Physiology, Plastic Surgery Second Edition, Stephen J. Mathes, MD. Elsevier. Philadelphia. 2006: vol 1, p:483-506
19. Fisher J., Gingrass MK. Basic Principles of Skin Flaps. Georgiade Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery. Georgiade GS, Riefkohl R, Levin LS. Third edition,. Williams & Wilkins. Baltimore, Maryland. 1997: 19-28
20. Smith JD, Pribaz JJ. Flaps. Plastic Surgery Indications, Operations, and Outcomes. Achauer BM, Eriksson E, Wilkins EG, VanderKam VM. Mosby, St. Louis, Missouri. 2000: vol. 1; 261-288.
21. Kerrigan C. L., Daniel R. K. Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg.* 71;519-524, 1983
22. Kerrigan C. L., Daniel R. K. Skin flap research: a candid view. *Plast Reconstr Surg.* 13;383-387, 1984
23. Kerrigan C. L. Skin flap failure: pathophysiology. *Plast Reconstr Surg.* 72; 766-777, 1983
24. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and Physiology of Skin Flap Surgery. *Plastic surgery.* J.G. McCharty. W.B. Saunders, Philadelphia 1990: Vol.1; 275-327
25. Kayser M. R. M.D. Surgical flaps. *Selected Readings in Plastic Surgery.* Vol 9, number 2, 1999
26. Mycek M. J., Harvey R. A., Champe P. C. Adrenergic antagonists. Mycek M. J., Champe P. C. (Eds.) *Lippincott's Illustrated Reviews: Pharmacology*, Second edition. Lippincott, Williams & Wilkins, Philadelphia. 7; 71-80, 2000

27. İskemi – reperfüzyon hasarında olan olaylar dizisi Sener G. Sakarcan A.Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia-reperfusion injury Mol Nutr Foot Res 2007;51:1345-1352.
28. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. British J of Surgery 1994; 81: 637-647.
29. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. Schwartz SI (ed), Principles of Surgery. Mc Graw-Hill 7th Edition 1999; Vol I: 13-32.
30. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. Circ Res. 2000;86: 117-118.
31. Kuzu MA, Koksoy C, Kale İT, Tanık A, Terzi C,Elhan AH, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. Am J of Surgery 1998; 176: 348-351.
32. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surgical Clinics of North America 1992; 72: 65-83
33. Terzi C, Kuzu A, Tanık A, Kale T, Aşlar K,Elhan A. Sıçanlarda intestinal iskemi modelinde proflaktik kısa ve uzun süreli yüksek doz Allopurinol kullanımının mortaliteye etkisi. Klinik ve Deneysel Cerrahi 2000, 8;1: 10-16.
34. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT.Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. Surgery 1998, 123;1: 79-88.
35. Ertan T, Soran A, Kılıc M, Aşlar AK, Koc M, Cengiz O. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin(TAS) onemi.Cerrahi Tıp Bulteni 2001,2;4: 154-167.

36. Sun Z, Wang X, Lasson A, Bojesson A, Annborn M, Andersson R. Effects of inhibition of PAF, ICAM-1 and PECAM-1 on gut barrier failure caused by intestinal ischemia and reperfusion. *Scand J Gastroenterol* 2001, 36;1: 55-65
37. Mishima S, Xu D, Lu Q, Deitch EA. The relationships among nitric oxide production, bacterial translocation, and intestinal injury after endotoxin challenge in vivo. *The J Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* 1998, 44;1: 175-182.
38. Stammberger U, Carboni GL, Hillinger S, Schneiter D, Weder W, Schmid RA. Combined treatment with endothelin- and PAF antagonists reduces posttransplant lung ischemia/reperfusion injury. *The Journal of Heart and Lung Transp* 1999, 18;9: 862-868.
39. Souza DG, Cara DC, Casalli GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonists UK74505 on local and remotereperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology* 2000; 131: 1800-1808
40. Huang HY, Helzlsouer KJ, Appel LJ. The effects of vitamin C and vitamin E on oxidative DNA damage: Results from a randomized controlled trial. *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention* 2000; 9: 647-652.
41. Marnett LJ. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis* 2000, 21;3:361-370
42. Unno N, Fink MP. Nutritional, physiologic, and pathophysiologic considerations of the gastrointestinal tract. Intestinal epithelial hyperpermeability. Mechanisms and relevance to disease. *Gastroenterology Clinics* 1998, 27;2: 289-307

43. Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, Organisciak DT. Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intensive visible light: Suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Biochemistry* 1995; 92: 1177-1181.
44. Chicago, IL: Information Resources Inc.; 2007.
45. Gulati O. Pycnogenol in venous disorders: a review. *Euro Bull Drug Res.* 1999;7(2):8-13.
46. Belcaro G, Cesarone MR, Errichi BM, et al. Diabetic ulcers: microcirculatory improvement and faster healing with pycnogenol. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006;12(3):318-323.
47. Liu X, Wei J, Tan F, Zhou S, Wurthwein G, Rohdewald P. Antidiabetic effect of Pycnogenol French maritime pine bark extract in patients with diabetes type II. *Life Sci.* 2004;75(21):2505-2513.
48. Trebaticka J, Kopasova S, Hradecna Z, et al. Treatment of ADHD with French maritime pine bark extract, Pycnogenol. *Eur Child Adolesc Psychiatry.* 2006;15(6):329-335.
49. Belcaro G, Cesarone MR, Errichi S, et al. Treatment of osteoarthritis with Pycnogenol<sup>®</sup>. The SVOS (San Valentino Osteo-arthritis Study). Evaluation of signs, symptoms, physical performance, and vascular aspects. *Phytother Res.* 2008;22(4):518-523.
50. Faird R, Mireizi Z, Mirheidari M, et al. Pycnogenol supplementation reduces pain and stiffness and improves physical function in adults with knee osteoarthritis. *Nutr Res.* 2007;27:692-697.

51. Noda Y, Anzai K, Mori A, Kohno M, Shinmei M, Packer L. Hydroxyl and superoxide anion radical scavenging activities of natural source antioxidants using the computerized JES-FR30 ESR spectrometer system. *Biochem Mol Biol Int.* 1997;42(1):35-44.
52. Cossins E, Lee R, Packer L. ESR studies of vitamin C regeneration, order of reactivity of natural source phytochemical preparations. *Biochem Mol Biol Int.* 1998;45(3):583-597.
53. Peng Q, Wei Z, Lau BH. Pycnogenol inhibits tumor necrosis factor $\alpha$ -induced nuclear factor kappa B activation and adhesion molecule expression in human vascular endothelial cells. *Cell Mol Life Sci.* 2000;57(5):834-841.
54. Rihn B, Saliou C, Bottin MC, Keith G, Packer L. From ancient remedies to modern therapeutics: pine bark uses in skin disorders revisited. *Phytother Res.* 2001;15(1):76-78.
55. Bito T, Roy S, Sen CK, Packer L. Pine bark extract pycnogenol downregulates IFN- $\gamma$ -induced adhesion of T cells to human keratinocytes by inhibiting inducible ICAM-1 expression. *Free Radic Biol Med.* 2000;28(2):219-227.
56. Grimm T, Chovanova Z, Muchova J, et al. Inhibition of NF-kappaB activation and MMP-9 secretion by plasma of human volunteers after ingestion of maritime pine bark extract (Pycnogenol). *J Inflamm (Lond).* 2006a;3:1.
57. Cho KJ, Yun CH, Yoon DY, et al. Effect of bioflavonoids extracted from the bark of *Pinus maritima* on proinflammatory cytokine interleukin-1 production in lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2000;168(1):64-71.

58. Virgili F, Kim D, Packer L. Procyanidins extracted from pine bark protect alpha-tocopherol in ECV 304 endothelial cells challenged by activated RAW 264.7 macrophages: role of nitric oxide and peroxynitrite. *FEBS Lett.* 1998;431(3):315-318.
59. Wei ZH, Peng QL, Lau BHS. Pycnogenol enhances endothelial cell antioxidant defenses. *Redox Rep.* 1997;3(4):219-224.
60. Wang S, Duanjun T, Yusheng Z. The effect of PycnogenolR on the microcirculation, platelet function and ischaemic myocardium in patients with coronary artery diseases. *Eur Bull Drug Res.* 1999;7:19-25.
61. Devaraj S, Vega-Lopez S, Kaul N, Schonlau F, Rohdewald P, Jialal I. Supplementation with a pine bark extract rich in polyphenols increases plasma antioxidant capacity and alters the plasma lipoprotein profile. *Lipids.* 2002;37(10):931-934.
62. Schafer A, Hogger P. Oligomeric procyanidins of French maritime pine bark extract (Pycnogenol) effectively inhibit alpha-glucosidase. *Diabetes Res Clin Pract.* 2007;77(1):41-46.
63. Kamuren ZT, McPeck CG, Sanders RA, Watkins JB, 3rd. Effects of low-carbohydrate diet and Pycnogenol treatment on retinal antioxidant enzymes in normal and diabetic rats. *J Ocul Pharmacol Ther.* 2006;22(1):10-18.
64. Dvorakova M, Sivonova M, Trebaticka J, et al. The effect of polyphenolic extract from pine bark, Pycnogenol on the level of glutathione in children suffering from attention deficit hyperactivity disorder (ADHD). *Redox Rep.* 2006;11(4):163-172.



65. Roseff SJ. Improvement in sperm quality and function with French maritime pine tree bark extract. *J Reprod Med.* 2002;47(10):821-824.
66. Rohdewald P. A review of the French maritime pine bark extract (Pycnogenol), a herbal medication with a diverse clinical pharmacology. *Int J Clin Pharmacol Ther.* 2002;40(4):158-168.
67. Internal Clinical Safety Report. Geneva, Switzerland: Horphag Research Management; October 26 2006.
68. Rodhewald P. Post Marketing Survey (PMS): Spontaneous reporting of unwanted/side effects with Pycnogenol®. Geneva, Switzerland: Horphag Research; 2007.
69. Pella D. Slovak Study. Geneva, Switzerland: Horphag Research; July 15 2005.
70. Arcangeli P. Pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Fitoterapia.* 2000;71(3):236-244.
71. Koch R. Comparative study of Venostasin and Pycnogenol in chronic venous insufficiency. *Phytother Res.* 2002;16 Suppl 1:S1-5.
72. Peng QL, Buz'Zard AR, Lau BH. Pycnogenol protects neurons from amyloid-beta peptide-induced apoptosis. *Brain Res Mol Brain Res.* 2002 Jul 15;104(1):55-65.
73. Cesarone MR, Belcaro G, Rohdewald P, et al. Comparison of Pycnogenol and Daflon in treating chronic venous insufficiency: a prospective, controlled study. *Clin Appl Thromb Hemost.* 2006;12(2):205-212.

74. Yang YS, Ahn TH, Lee JC, Moon CJ, Kim SH, Jun W, Park SC, Kim HC, Kim JC. Protective effects of Pycnogenol on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in Sprague-Dawley rats. *Food Chem Toxicol.* 2008 Jan;46(1):380-7. Epub 2007 Aug 21
75. Ozer Sehirli A, Sener G, Ercan F. Protective effects of pycnogenol against ischemia reperfusion-induced oxidative renal injury in rats. *Ren Fail.* 2009;31(8):690-7. doi: 10.3109/08860220903085971.
76. Peng YJ, Lee CH, Wang CC, Salter DM, Lee HS. Pycnogenol attenuates the inflammatory and nitrosative stress on joint inflammation induced by urate crystals. *Free Radic Biol Med.* 2012 Feb 15;52(4):765-74. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2011.12.003. Epub 2011 Dec 13.
77. Blazsó G, Gábor M, Schönlau F, Rohdewald P Pycnogenol accelerates wound healing and reduces scar formation. *Phytother Res.* 2004 Jul;18(7):579-81.
78. Mochizuki M, Hasegawa N. Therapeutic efficacy of pycnogenol in experimental inflammatory bowel diseases. *Phytother Res.* 2004 Dec;18(12):1027-8.
79. Moraes Ramos FM, Schönlau F, Novaes PD, Manzi FR, Bóscolo FN, de Almeida SM. Pycnogenol protects against Ionizing radiation as shown in the intestinal mucosa of rats exposed to X-rays. *Phytother Res.* 2006 Aug;20(8):676-9.
80. Nocun M, Ulicna O, Muchova J, Durackova Z, Watala C. French maritime pine bark extract Pycnogenol reduces thromboxane generation in blood from diabetic male rats. *Biomed Pharmacother.* 2008 Mar;62(3):168-72. Epub 2007 Jul 30.

81. Jankyova S, Kucera P, Goldenberg Z, Yaghi D, Navarova J, Kyselova Z, Stolc S, Klimas J, Racanska E, Matyas S. Pycnogenol efficiency on glycaemia, motor nerve conduction velocity and markers of oxidative stress in mild type diabetes in rats. *Phytother Res.* 2009 Aug;23(8):1169-74. doi: 10.1002/ptr.2776.
82. Koláček M, Muchová J, Vranková S, Jendeková L, Pecháňová O, Uličná O, Watala C, Duračková Z. Effect of natural polyphenols, pycnogenol® on superoxide dismutase and nitric oxide synthase in diabetic rats. *Prague Med Rep.* 2010;111(4):279-88.
83. Aydin B, Unsal M, Sekeroglu ZA, Gülbahar Y. The antioxidant and antigenotoxic effects of pycnogenol(®) on rats treated with cisplatin. *Biol Trace Elem Res.* 2011 Sep;142(3):638-50. doi: 10.1007/s12011-010-8781-3. Epub 2010 Jul 30.
84. Kim SH, Lee IC, Lim JH, Moon C, Bae CS, Kim SH, Shin DH, Park SC, Kim HC, Kim JC. Protective effects of pine bark extract on developmental toxicity of cyclophosphamide in rats. *Food Chem Toxicol.* 2012 Feb;50(2):109-15. doi: 10.1016/j.fct.2011.10.048. Epub 2011 Oct 19.
85. Parveen K, Ishrat T, Malik S, Kausar MA, Siddiqui WA. Modulatory effects of Pycnogenol in a rat model of insulin-dependent diabetes mellitus: biochemical, histological, and immunohistochemical evidences. *Protoplasma.* 2013 Feb;250(1):347-60. doi: 10.1007/s00709-012-0418-2. Epub 2012 Jun 3.
86. Mei L, Mochizuki M, Hasegawa N. Hepatoprotective effects of pycnogenol in a rat model of non-alcoholic steatohepatitis. *Phytother Res.* 2012 Oct;26(10):1572-4. doi: 10.1002/ptr.4602. Epub 2012 Feb 1.

87. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: A review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg* 1992; 90(2):319-28.
88. Donovan WE. Experimental Models in Skin Flap Research. In: Grabb WC, Myers MD, eds. *Skin Flaps*. Boston: Little Brown, 1975
89. Bayramiçili M. *Deneysel mikrocerrahi*. İstanbul: Nobel Tıp, 2005
90. Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, Siemionow M, Atabay K. Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2008 Aug;61(8):939-48. Epub 2007 Jul 16.
91. Ünal Şakir, Özmen, Selahattin, Demir Yavuz , Yavuzer Reha , Latifoglu Osman, Atabay Kenan The Effect of Gradually Increased Blood Flow on Ischemia-Reperfusion Injury. *Annals of Plastic Surgery*: October 2001 - Volume 47 - Issue 4 - p 412-416
92. Gürke L, Marx A, Sutter PM, Stierli P, Harder F, Heberer M Function of fast- and slow-twitch rat skeletal muscle following ischemia and reperfusion at different intramuscular temperatures. *Eur Surg Res*. 2000;32(3):135-41.
93. Demir Y, Ayhan S, Unal S, Erdem OS, Latifoglu O, Atabay K. Effect of warm ischemia on neovascularization of island flaps. *J Reconstr Microsurg*. 2001 Nov;17(8):643-9; discussion 650-1.
94. Kim JG, Lee J, Roe J, Tromberg BJ, Brenner M, Walters TJ. Physiol Meas. Hemodynamic changes in rat leg muscles during tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury observed by near-infrared spectroscopy. 2009 Jul;30(7):529-40. doi: 10.1088/0967-3334/30/7/001. Epub 2009 May 13.

95. Loerakker S, Manders E, Strijkers GJ, Nicolay K, Baaijens FP, Bader DL, Oomens CW. The effects of deformation, ischemia, and reperfusion on the development of muscle damage during prolonged loading. *J Appl Physiol*. 2011 Oct;111(4):1168-77. doi: 10.1152/jappphysiol.00389.2011. Epub 2011 Jul 14.

96. Loerakker S, Oomens CW, Manders E, Schakel T, Bader DL, Baaijens FP, Nicolay K, Strijkers GJ. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T2-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med*. 2011 Aug;66(2):528-37. doi: 10.1002/mrm.22801. Epub 2011 Feb 25.