

T. C.

CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

**CİLT FLEPLERİNDE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINDA
RESVERATROLÜN ETKİNLİĞİNİN DEĞERLENDİRİLMESİ**

UZMANLIK TEZİ

Arş. Gör. Dr. Melike Güngör

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Levent Yoleri

Manisa, 2011

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bana bilgi ve deneyimleri ile yol gösteren, ışık tutan çok değerli hocalarım Prof. Dr. Levent Yoleri'ye, Prof. Dr. Ahmet Seyhan'a ve Yrd. Doç. Dr. Hakan Kerem'e; tez çalışmalarım sürecinde yardımını esirgemeyen Doç. Dr. Seda Vatansever'e; cerrahinin tüm güzellik ve zorluklarını birlikte yaşadığım asistan arkadaşlarıma ve tüm klinik çalışanlarına; bu zorlu süreçte sabır ve özverisini esirgemeyen sevgili eşime, cerrahi meslek aşkını bana aşılıyarak bu güzel mesleğe adım atmama önayak olan sevgili babam Op. Dr. Dünder Yazoğlu'na ve daima desteklerini yanımda hissettiğim tüm aileme sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Bu çalışma Celal Bayar Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi tarafından desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. Giriş	1
2. Genel Bilgiler	3
2.1. Flep fizyolojisi	3
2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	5
2.2.1. Serbest Oksijen Radikalleri	6
2.2.1.1. Serbest Radikal Kaynakları	7
2.2.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri	8
2.2.1.2.1. Hücre İçi Etkileri	9
2.2.1.2.1.1. Lipidler Üzerine Etkileri	9
2.2.1.2.1.2. Proteinler Üzerine Etkileri	10
2.2.1.2.1.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri	10
2.2.1.2.1.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri	10
2.2.1.2.2. Hücre Dışı Etkileri	10
2.2.1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri	12
2.2.1.3.1. Endojen Antioksidanlar	13
2.2.1.3.2. Ekzojen Antioksidanlar	14
2.2.2. İ/R Hasarında Etkili Olan Diğer Faktörler	14
2.2.2.1. Nitrik Oksit (NO)	14
2.2.2.2. Araşidonik Asit Metabolitleri	15
2.2.2.3. Mast Hücreleri	16
2.2.2.4. Apoptozis	16
2.3. Resveratrol	18
2.3.1. Resveratrolün Biyolojik Aktivitesi	19
2.3.1.1. Antioksidan Etki	20
2.3.1.2. Antiinflamatuvar Etki	20
2.3.1.3. Antiagregan Etki	21

2.3.1.4. Vazorelaksan Etki	22
2.3.1.5. Anjiogenez Üzerine Etki	22
2.3.1.6. Apoptozis Üzerine Etki	23
2.3.1.7. Antikanser Etki	23
2.3.1.8. Östrojen Benzeri Etki	24
2.3.2. Resveratrolün Yan Etkileri	24
3. Gereç ve Yöntem	26
3.1. Deney Hayvanları	26
3.2. Deney Grupları	26
3.3. Deneysel İşlemler	26
3.4. Deney Hayvanlarının Bakımı	30
3.5. Değerlendirmeler	31
3.5.1. Yaşayan Flep Oranının Değerlendirilmesi	31
3.5.2. Histolojik Değerlendirme	31
3.5.2.1. Parafin Doku Takibi	31
3.5.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması	32
3.5.2.3. İndirek İmmunohistokimya Boyaması	33
3.5.2.4. TUNEL Boyaması	35
3.5.3. İstatiksel Değerlendirme	38
4. Bulgular	39
4.1. Yaşayan Flep Oranı	39
4.2. Histolojik Değerlendirme	42
4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması	42
4.2.2. İndirek İmmunohistokimya Boyaması	44
4.2.3. TUNEL Boyaması	48
5. Tartışma	50

6. Sonuç ve Öneriler	58
7. Özet	59
8. İngilizce Özet	60
9. Kaynaklar	62

1. GİRİŞ

Defekt onarımı plastik cerrahinin temel ilgi alanıdır. Plastik cerrahinin gelişimiyle birlikte defekt onarımında pek çok yöntem tanımlanmış ve yöntemler basitten karmaşığa doğru sıralanarak rekonstrüksiyon merdiveni oluşturulmuştur. Halen günümüzde rekonstrüksiyon merdiveni geçerliliğini korusa da daha iyi fonksiyonel ve kozmetik sonuçlar elde etmek amacı ile artan bilgi ve teknoloji sayesinde daha üst basamaklar ilk tedavi seçeneği olabilmektedir(1). Bu nedenle flepler plastik cerrahi pratiğinde sıkça tercih edilen rekonstrüksiyon yöntemidir.

Flep cerrahisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri ilk kez 1968 yılında Ames ve arkadaşları tarafından tanımlanan iskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarıdır(2). Rekonstrüktif cerrahide flep cerrahisinin önemi düşünülürse İ/R hasarının nedenlerini ve önleme yollarını öğrenmenin ne denli kıymetli olduğu anlaşılabilir(3).

Belli bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, yani iskemi durumunda, hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyebilen bir dizi olay gerçekleşir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. İskemide aerobik metabolizmanın temel yakıtı olan oksijenin bulunmaması nedeni ile anaerobik metabolizma devreye girer. Bu durum yetersiz enerji üretimine, toksik metabolitlerin birikimine, asidoza ve iyon dengesizliklerine neden olup hücre ölümü ile sonuçlanabilir(4-7).

Bu süreci kırarak durum dokuya yeniden oksijenin getirilmesi yani kan akımının sağlanmasıdır ki bu da reperfüzyon olarak adlandırılır. Reperfüzyonun dokuya enerji için yakıt sağlaması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi olumlu etkileri mevcuttur. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü hücre hasarını arttıran yeni bir patofizyolojik

süreci de beraberinde getirir. Reperfüzyon hasarından başta serbest oksijen radikalleri olmak üzere pek çok madde sorumludur(4,8,9).

Klinikte pek çok hekim İ/R hasarının farklı organ sistemlerindeki etkileri ile baş etmek zorunda kalmıştır(10). Hipovolemik şok, inme, miyokard infarktüsü, organ nakli bu farklı alanlarda karşılaşılan durumlara örnektir(3,11).

Plastik cerrahide ise İ/R hasarı ile, replantasyon ve serbest flep uygulamaları başta olmak üzere flep cerrahisinde karşılaşılr(3,11).

Resveratrol (3,4',5 trihidroksistilben) üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan doğal antioksidan maddedir(12). Resveratrolün farklı biyolojik etkileri tanımlanmıştır. Bu etkiler östrojenik etki(13), anti-kanser etki(14), vazodilatatör etki(15), trombosit agregasyon inhibisyonu(12), antiinflamatuvar etki(16), lipid peroksidasyon inhibisyonu(17), katalitik metal iyonlarla şelasyon yapma kapasitesi(17,18), serbest radikal süpürücü etki(17) ve antioksidan seviyelerini yükseltme etkisidir(19).

Resveratrolün beyin, karaciğer, barsak, kas gibi farklı dokularda oluşturulan İ/R hasarında etkinliğini araştıran çeşitli çalışmalar yapılmıştır (20-23).

Bu çalışmanın amacı, rekonstrüktif cerrahide önemli bir yer tutan cilt fleplerinde geliştirilecek İ/R hasarında resveratrolün etkinliğinin araştırılmasıdır. Etkinliğinin ispatlanması durumunda cilt fleplerinde gelişen İ/R hasarına bağlı kayıpların üstesinden gelebilmek için plastik cerrahi pratiğinde resveratrolün kullanılabilirliği düşünülmüştür.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flep Fizyolojisi

Bir flebin yaşayabilirliğini belirleyen temel faktör flebin intrinsek vasküleritesidir. Bu nedenle flep vasküler fizyolojisini anlamak ve optimize etmek flep cerrahisinde başarıya giden yoldur.

Tüm dokularda olduğu gibi fleplerde de makro ve mikro dolaşım vardır. Makro dolaşım sistemi major arter ve venlerden oluşurken, mikro dolaşım arterioller, kapillerler, venüller ve arteriovenöz anastomozlardan oluşur. Perfüzyonun kontrolü büyük oranda mikro dolaşım düzeyinde gerçekleşir(11).

Normal deri kan akımı 100 gr doku başına yaklaşık 20 ml'dir. Bu oran kaslar için önemli ölçüde yüksektir(24). Bu farklılık kasların yüksek metabolik aktivitelerinden kaynaklanır. Flep sağkalımı da, flebe gelen kan akımı ile flebin metabolik ihtiyaçları arasındaki dengeye dayanmaktadır(11).

Deri kan akımı lokal ve sistemik olmak üzere iki seviyede kontrol edilir. Sistemik kontrol nöral ya da hormonal olabilir. Nöral kontrol daha baskındır(24). Nöral kontrol sempatik lifler aracılığı ile arterioller ve arteriovenöz anastomoz seviyelerinde gerçekleşir. α adrenerjik ve serotonerjik reseptörler vazokonstrüksiyona sebep olurken, adrenerjik reseptörler vazodilatasyona yol açar. Hormonal kontrol sistemik vazoaktif maddelerin kendilerine özgü reseptörlerindeki aktiviteleri ile sağlanır. Vazokonstriktörler epinefrin, norepinefrin, serotonin, tromboksan A_2 ve prostoglandin $F_{2\alpha}$ 'yı içerir. Vazodilatatörler ise prostaglandin E_1 , prostaglandin I_2 (prostasiklin), histamin, bradikinin, lökotrien C_4 ve D_4 'den oluşur(11).

Lokal kontrolde ise hiperkapni, hipoksi, asidoz ve hipertermi vazodilatasyona sebep olurken, hipotermi vazokonstriksiyona neden olur(11).

Deri kan akımının düzenlenmesinde temel rollerden biri derinin vücudun termoregülatuar organı olması ile ilgilidir. Çünkü vücudun ısı ayarlaması deri

kan akımının ayarlanması ile yapılır. Regülasyon arterioller seviyede gerçekleşir. Sempatik etki ile prekapiller sfinkter kasılır ve kan kapiller yatağı bypass ederek arteriovenöz anastomoza geçer. Böylece deri kan akımı azalır ve vücut ısısı korunmuş olur. Ters durumda ise deri kan akımı artırılarak vücut ısısı azaltılır(11).

Flep elevasyonu ile hassas bir şekilde ayarlanmış doku kan akımı dengesi bozulur ve dramatik değişiklikler meydana gelir. Sempatik innervasyonda ani bir kayıp olur ve bu vazokonstriktör nörotransmitterlerin spontan salınımına yol açar. Damarların kesilmesi kan akımını önemli ölçüde azaltır. Lökosit aracılı endotel hasarı başlar. Sonuçta flep periferal kısımları akut olarak iskemiyeye maruz kalır(24). Yapılan çalışmalar flep tabanında akım korunsa bile flebin uç kısmındaki akımın ilk 6-12 saatte normal akımın % 20'sinin altına düştüğünü göstermiştir. Bu distal kısmın yaşayabilmesi için doku tipine bağlı olarak yeterli kan akımının 6-12 saatte gelmesi gerekir. Aksi takdirde doku ölecektir. Yeterli akımın gelmesi, nörotransmitterlerin 12-24 saatte tükenmesi ve flep yatağından inoskülasyonun 2-3 günde gerçekleşmesiyle flep perfüzyonu dereceli olarak düzeler. Akım 1.-2. haftada % 75, 3.-4. haftada % 100'e ulaşır(11,25-28). Ancak doku 6-12 saatten daha uzun süren ciddi bir iskemiyeye maruz kalmışsa, akım geri dönse bile doku hasarı devam edecek ve nekroz ile sonuçlanacaktır. Bunun sebebi iskemik hasara reperfüzyon hasarının eklenmesidir(11).

Flep kayıplarının sebepleri araştırıldığında hatalı flep planlamasının önemli bir sebep olduğu görülür. Random flepler aksiyal fleplere göre daha az güvenilir fleplerdir. Random flep planlamasında en/boy oranı dikkate alınmalıdır. Kötü teknik flep kaybının diğer önemli bir nedenidir. Örneğin serbest flep uygulamalarında anastomoz hattında düzgün endotel uzanımı elde edilemezse tromboz oluşacak ve sekonder iskemiyeye ile karşılaşılacaktır. Mikrosirkülasyonu etkileyen hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, hiperkoagülabiliteye eğilim gibi sistemik faktörler, pedikülde katlanma, hematoma, aşırı gerginlik gibi flebe bası yapan lokal sebepler flep kaybına neden olabilir(11,29-31).

2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, ilk olarak hücrelerin aerobik solunum metabolizması etkilenir. Aerobik solunumun durması hücrenin temel yakıtı olan adenozin trifosfat (ATP) yapımını belirgin olarak azaltır. ATP'nin azalması aşağıda sayılan hücre içindeki birçok sistemi etkiler:

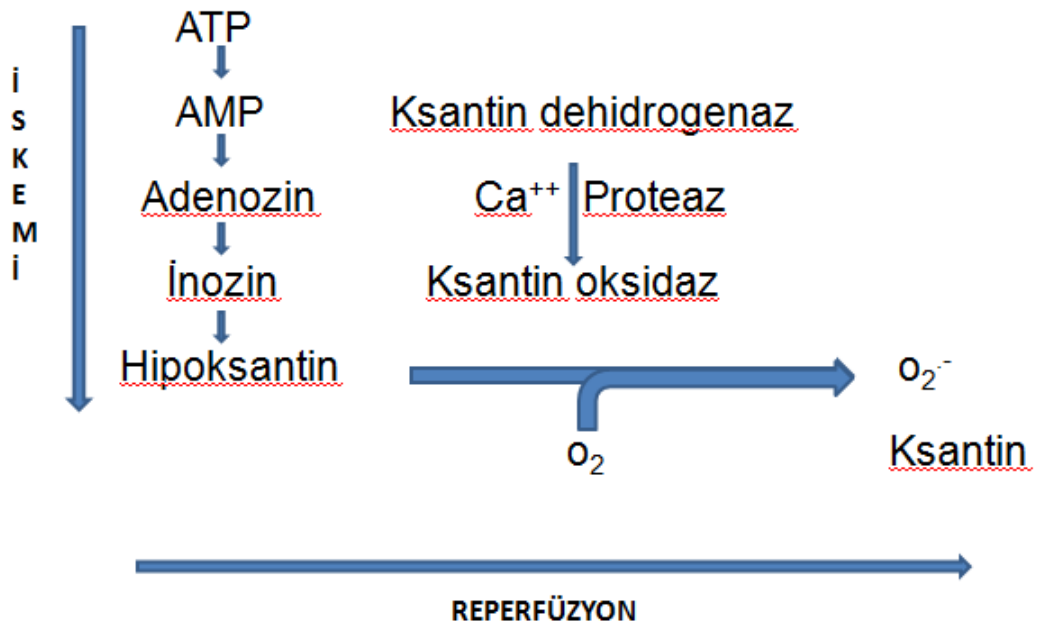
1. ATP miktarında azalma anaerobik metabolizmanın devreye girmesine neden olur. Bunun sonucunda laktik asit, inorganik fosfat birikir. Bu da hücre içi pH'nın düşmesine yol açar(32). Bu anaerobik metabolizma sürecinde ATP hipoksantine kadar yıkılır. Hipoksantin süperoksit anyonu üretiminde substrat olması nedeni ile önem taşır(11).

2. ATP'nin azalması membranda bulunan ATP bağımlı pompaların çalışmasını engeller. Bu durumda potasyum (K^+) hücre dışına çıkarken, sodyum (Na^{++}) ve kalsiyum (Ca^{++}) hücre içinde birikir. Yani bir iyon dengesizliği oluşur. Na^{++} 'un hücre içinde artışı su artışına sebep olur ve akut hücresel şişme meydana gelir. Bu şişme, inorganik fosfat, laktik asit gibi metabolitlerin birikimi ile artan ozmotik yüke bağlı olarak daha da artar. Hücre içinde Ca^{++} artışının tek nedeni hücre dışından Ca^{++} girişi değildir. Ayrıca hücre içi stoklardaki (mitokondri ve endoplazmik retikulum) Ca^{++} da serbest kalır. Artan sitoplazmik Ca^{++} 4 enzim grubunu aktive eder. Bu enzimler; ATPazlar, endonükleazlar, fosfolipazlar ve proteazlardır. ATPazlar, ATP kaybını hızlandırırlar. Endonükleazlar genetik materyali parçalarlar. Fosfolipazlar membran fosfolipidlerini yıkarak membran hasarına yol açmalarının yanı sıra araşidonik asit metabolizmasını başlatırlar. Araşidonik asit metabolitlerinden İ/R hasarında rol oynamaları nedeni ile ileride daha ayrıntılı olarak bahsedilecektir. Proteazlar membran ve hücre iskeletinde bulunan proteinleri parçalarlar(32). Bu Ca^{++} ile aktive olan proteazlardan bir tanesi ksantin dehidrogeaz enzimini ksantin oksidaza çevirmektedir. Ksantin oksidaz enzimi serbest radikal oluşumunu başlattığı için önemlidir(11).

İskemi evresinde serbest oksijen radikali oluşumu için gerekli olan substrat yani hipoksantin ve enzim yani ksantin oksidaz sağlanmış olur.

Hasarın geri dönüşümsüz hale gelme süresi, iskeminin şiddetine ve hücre tipine bağlıdır. Bu süre beyin hücreleri için birkaç dakika iken, kas hücreleri için 4-6 saat, deri hücreleri için ise 6-12 saattir(4-7,11,33). Bu süreler aşıldıktan sonra ortama tekrar kan akımı gelse dahi paradoksal olarak doku hasarı hızlanacaktır. Bu reperfüzyon hasarı olarak adlandırılır(33-37).

Reperfüzyon ile ortama gelen oksijen iskemi döneminde oluşan hipoksantin ve ksantin oksidazla reaksiyona girerek yan ürün olarak süperoksit anyonunu oluşturur (Şekil 1). Böylece hücre hasarında etkin rol oynayan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar(11).



Şekil 1: Süperoksit serbest radikalinin oluşumu

2.1.1. Serbest Oksijen Radikalleri

Serbest radikaller, dış orbitallerinde ortaklanmamış elektron içeren atom veya moleküllerdir. Bu ortaklanmamış elektron söz konusu kimyasal türün reaktivitesini olağanüstü artırır. Bu nedenle serbest radikallerin ömürleri çok kısadır, ancak aktif yapıları nedeni ile tüm hücre bileşenleri ile etkileşebilirler.

Biyolojik sistemlerdeki en önemli serbest radikaller oksijenden oluşur(35,38). Önemli reaktif oksijen türleri aşağıda sıralanmıştır:

1. Süperoksit radikali (O_2^-): Tüm aerobik hücrelerde oksijen molekülünün bir elektron alarak indirgenmesi sonucu meydana gelir. Reaktivitesi düşük

olan süperoksit radikalının asıl önemi hidrojen peroksit kaynağı olmasıdır(35,39).

2. Hidrojen peroksit (H_2O_2): Yapısında ortaklanmamış elektron içermediği için radikal özelliği taşımaz. Reaktif tür olarak bilinmesinin nedeni demir (Fe^{++}) veya diğer geçiş metallerinin varlığında hidroksil radikaline dönüşmesidir. Süperoksit radikalinden farklı olarak biyolojik zarları kolayca geçebilme özelliğine sahiptir(40).

3. Hidroksil radikali ($OH\cdot$): Reaktif oksijen türleri içerisinde bilinen en güçlü ve en reaktif olandır. Yarı ömrü çok kısadır ve bu nedenle olduğu yerde veya hemen yakınında etkisini gösterir(35,38,39).

Ayrıca geçiş metallerinin, özellikle de demir ve bakır iyonlarının serbest radikal reaksiyonlarını hızlandıran katalizör etkisi gördükleri saptanmıştır(41-43).

2.2.1.1. Serbest Radikal Kaynakları

Reaktif oksijen ürünleri aerobik canlılarda sürekli ancak, az miktarlarda üretilirler. Toksik etkilerden biyolojik ihtiyacın üzerinde üretilen radikaller sorumludur(38,39). Aşağıda serbest radikallerin başlıca kaynakları sıralanmıştır:

1. Fizyolojik oksidasyon-redüksiyon reaksiyonları: Bu reaksiyonlar içinde en büyük serbest radikal kaynağı elektron transport zinciridir(35,38). Normal aerobik metabolizma sırasında %2'den daha az elektronun moleküler oksijene sızması ile süperoksit radikali oluşur. Normal şartlarda oluşan bu süperoksit radikali süperoksit dismutaz (SOD) enzimi ile nötralize edilir. SOD süperoksitin spesifik yakalayıcısı olan antioksidan bir enzimdir(44).

2. Polimorfonükleer lökositler: Aktive nötrofiller bakterisidal görevleri nedeni ile serbest radikal üretirler. NADPH oksidaz aktivitesi ile süperoksit radikali, myeloperoksidaz aktivitesi ile hidrojen peroksit ve hipoklorik asit ($HOCl$), Fenton reaksiyonu ile de hidroksil radikali oluştururlar. Radikaller yalnızca membran ile bakteri arasında oluşmasına rağmen, bir miktar ürün kaçıışı olabilir(32,45).

3. Radyant enerji (ultraviyole, X ışını) absorpsiyonu: İyonize radyasyonun suyu hidroksil ve hidrojen ($H\cdot$) radikallerine çevirmesi buna örnektir(32).

4. Ekzojen kimyasal maddelerin detoksifikasyonu: Örneğin kuru temizlemede kullanılan karbontetraklorür'ün (CCl_4) detoksifikasyonu esnasında triklorometil ($CCl_3\cdot$) ve peroksil ($CCl_3O_2\cdot$) serbest radikalleri oluşur(32).

5. Araşidonik asit metabolizması: Membran fosfolipidlerinden fosfolipazlar yoluyla açığa çıkan araşidonik asit lipooksijenaz ve siklooksijenaz olmak üzere 2 ana yol ile metabolize olur. Lipooksijenaz yolunda lökotrienler oluşurken, siklooksijenaz yolunda prostoglandinler ve tromboksan A_2 oluşur(11). Membran fosfolipidlerinin metabolizması esnasında oluşan ürünlerin respiratuar patlamayı aktive ederek serbest radikal oluşumunu tetiklediği gösterilmiştir(46).

6. Ksantin oksidaz yolu: Daha önce anlatıldığı üzere iskemi sırasında ksantin dehidrogenaz'dan oluşan ksantin oksidaz reperfüzyon ile gelen oksijen sayesinde hipoksantini ksantine çevirirken yan ürün olarak süperoksit radikali üretir.

İskeminin yol açtığı bu dönüşüm farklı organlarda farklı hızlarda gerçekleşir. Barsak ve karaciğerde dönüşüm çok kısa süreli iskemilerde bile görülürken, iskelet kası ve deride daha uzun süreler gerektirir. Bu durum farklı organların İ/R hasarına yanıtlarının farklı olmasının diğer bir nedeni olabilir(47).

Ksantin oksidaz enziminin kapiller endotel hücrelerinde aynı dokudaki diğer hücrelere göre 100 kat fazla bulunduğu gösterilmiştir(48). Reperfüzyon ile gelen oksijenle ilk karşılaşan da yine endotel hücreleridir. Bu nedenle endotel hücrelerinin serbest radikal üretiminin ana merkezi olmaları muhtemeldir(49).

2.2.1.2. Serbest Radikallerin Etkileri

Serbest radikallerin etkilerini hücre içi ve hücre dışı etkiler şeklinde ikiye ayırabiliriz.

2.2.1.2.1. Hücre İçi Etkileri

Serbest radikaller membran lipidleri, proteinler, nükleik asitler ve karbonhidratlar ile reaksiyona girerek hücrede ciddi hasarlara yol açarlar(35,50). Bu etkiler serbest radikallerin direkt sitotoksik etkileridir(11).

2.2.1.2.1.1. Lipidler Üzerine Etkileri

Membran lipidleri serbest radikal etkilerine karşı en hassas biyomoleküllerdir. Doymamış yağ asitlerinin oksidatif yıkımı lipid peroksidasyonu olarak bilinir. Lipid peroksidasyonunun uyarılmasında asıl etkili radikalın hidroksil radikali olduğu bilinmektedir(50,51).

Lipid peroksidasyonu kendi kendini devam ettiren zincir reaksiyonu şeklinde ilerler. Yağ adisi (LH) ile birleşen radikal bir dizi tepkimeyi başlatmaktadır(52). Serbest radikal membran yapısında bulunan yağ asitlerindeki konjuge çift bağlardan bir elektron içeren hidrojen atomunu çıkarır ve bunun sonucunda yağ asidi zinciri bir lipid radikali (L \cdot) niteliği kazanır. Lipid radikali dayanıksız bir bileşiktir ve bir dizi değişikliğe uğrar. Lipid radikalının moleküler oksijenle etkileşmesi sonucu lipid peroksit radikali (LOO \cdot) oluşur. Lipid peroksit radikali membran yapısındaki diğer poliansatüre yağ asitlerini etkileyerek yeni lipid radikallerinin oluşumuna yol açarken kendisi de açığa çıkan hidrojen atomunu alarak lipid hidroperoksite (LOOH) dönüşür. Böylece olay kendi kendini katalizleyerek devam eder(50). Şekil 2'de reaksiyon dizileri özetlenmiştir.



Şekil 2: Lipid peroksidasyonu

Lipid hidroperoksitleri yıkıldığı zaman aldehitler oluşur. Bu aldehitlerin başında gelen malondialdehit lipid peroksidasyonunun değerlendirilmesinde sıkça kullanılmaktadır. Serbest radikal indikatörü olarak kabul edilir(50-51).

Lipid peroksidasyonu plazma ve organel membranlarının bozulmasına neden olur. Bu olay hücre yapısı ve fonksiyonlarını dramatik bir şekilde etkiler(53).

2.2.1.2.1.2. Proteinler Üzerine Etkileri

Proteinler serbest radikallere karşı lipidlerden daha az hassastırlar. Proteinlerin serbest radikal harabiyetinden etkilenme derecesi aminoasit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış bağ ve kükürt içeren triptofan, tirozin, fenilalanin, histidin, metiyonin, sistein gibi aminoasitlere sahip proteinler serbest radikallerden kolaylıkla etkilenirler. Bu etki sonucunda sülfür radikalleri ve karbon merkezli radikaller oluşur. Ayrıca prolin ve lizin aminoasitleri de radikallere maruz kalınca hidroksilasyona uğrayabilir.

Proteinlerin serbest radikaller ile hasarlanması sonucunda, proteinlerin görev aldığı sinyal transdüksiyon mekanizmaları, transport sistemleri ve enzimleri içeren çeşitli hücresele fonksiyonlar da zarar görecektir(35,50,54).

2.2.1.2.1.3. Nükleik Asitler Üzerine Etkileri

Serbest radikaller DNA'da mutasyonlara sebep olurlar. Bu da hücre ölümü ya da kanser gelişimi ile sonuçlanır(55,56).

2.2.1.2.1.4. Karbonhidratlar Üzerine Etkileri

Serbest radikaller monosakkaritlerin oksidasyonu ile hidrojen peroksit, peroksit ve okzoaldehitleri oluştururlar(35).

2.2.1.2.2. Hücre Dışı Etkileri

Serbest radikallerin hücre dışı etkileri nötrofiller üzerinden gerçekleşir. Radikallerin hücre içinde gerçekleştirdikleri direkt sitotoksik etkileri dışında kemotaktik etki ile ortama nötrofilleri çağırarak indirekt etkileri de söz konusudur(11).

Süperoksit radikali nötrofiller üzerinde yüksek kemotaktik etkiye sahiptir(57). İ/R hasarında nötrofiller için kemotaktik etki gösteren diğer ajanların başında kompleman 5a (C5a), araşidonik asit metabolitlerinden lökotrien B₄ (LTB₄), interlökin 8 (IL-8) ve trombosit aktive edici faktör (PAF) gelir(58).

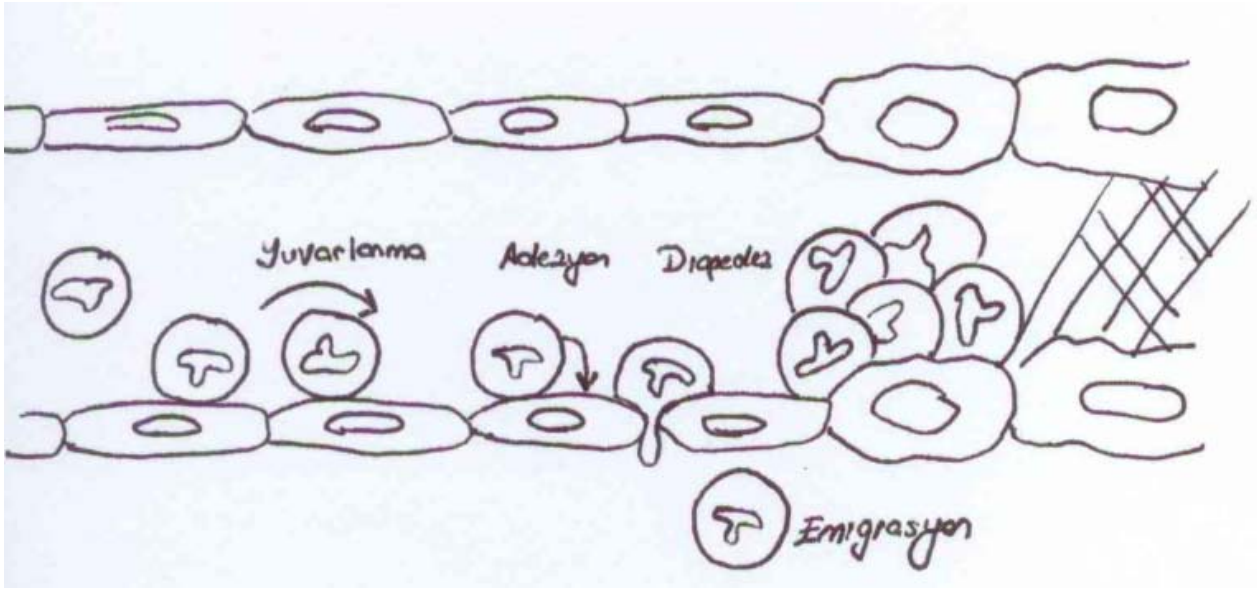
Kemotaktik etki ile aktive olan nötrofiller endotelle iletişime geçer. Nötrofil endotel etkileşimi İ/R'da damar ve doku hasarında pivot rol oynar(59). İntravital mikroskopi ile mikro dolaşımın gözlenmesi sonucunda olaylar dizisi aydınlatılmıştır(60-62).

Nötrofiller inflamasyon bölgesinde laminer akımı terk edip, damar periferine doğru göç ederler. Bu olay marjinasyon olarak adlandırılır. Ardından nötrofiller venüllerdeki endotelial yüzeyde geçici olarak yapışarak yuvarlanırlar. Bu olay yuvarlanma (rolling) olarak bilinir. Yuvarlanma olayında anahtar-kilit ilişkisi gösteren adezyon molekülleri görev almaktadır. Bu adezyon moleküllerinden nötrofil yüzeyinde bulunanlar L-selektin, endotel yüzeyinde bulunanlar ise E ve P-selektindir. Bu selektinler bazı şekerleri bağlayarak geçici ve gevşek adezyonu sağlarlar(11,58). Yuvarlanma olayının düzenlenmesinde bazı maddeler görev almaktadır. Başta serbest oksijen radikalleri olmak üzere erken inflamasyon döneminde salınan trombin ve histamin P-selektin ekspresyonunu artırırken, IL-1 ve tümör nekrotizan faktör- α (TNF- α) L-selektin ve E-selektin ekspresyonunu artırarak yuvarlanma olayını indüklemektedir(63-65). Serbest oksijen radikallerinin nötrofil yuvarlanmasını tetiklediği deneysel çalışmalarda gösterilmiştir(66,67).

Bu gevşek bağlanmanın ardından nötrofiller endotel yüzeyine sıkıca bağlanırlar. Bu durum adezyon olarak adlandırılır. Adezyondandan nötrofil yüzeyinde bulunan integrinler (CD11/CD 18) ve endotel yüzeyinde bulunan ve ligand görevi gören intersellüler adezyon molekülü-1 (ICAM-1) ve vasküler adezyon molekülü (VCAM-1) sorumludur. Trombosit aktive edici faktör (PAF), C5_a ve IL-8'in adezyonu başlatıcı etkisi vardır(11).

Nötrofiller sıkı bağlanmayı takiben endotel hücreleri arasındaki bağlantılardan geçerler. Bu diapedez olarak adlandırılır. Ardından çevre dokulara göç ederler ki buda emigrasyon olarak bilinmektedir(58).

Nötrofillerin endotele sıkıca yapışmaları sonucunda ürettikleri serbest radikaller, proteazlar ve diğer toksik ürünler aracılığı ile endotele zarar verirler(68). Böylece mikrovasküler dolaşım bütünlüğü bozulur, ödem artar, hemoraji ve tromboz gelişir(11). Ayrıca nötrofillerin damar duvarına yapışıp damar içinde birikmeleri mikro dolaşımda oklüzyonlara neden olur. Bu kapiller tıkaçlar reperfüzyonla gelen kan akımını keser. Bu durum “no-reflow” fenomeni olarak adlandırılır. Sonuç olarak nötrofiller doku hasarında aktif rol oynarlar(69). Şekil 3’de nötrofillerin İ/R hasarındaki rolleri özetlenmiştir.



Şekil 3: İ/R'da nötrofillerin rolü

Nötrofillerin İ/R hasarında önemli rol oynadıkları nötrofil sayısını azaltan, adezyonunu veya fonksiyonlarını bozan ajanlarla yapılan çalışmalarda doku hasarının önemli ölçüde azaldığı gösterilerek kanıtlanmıştır(10,70,71).

2.2.1.3. Antioksidan Savunma Sistemleri

Organizmada fizyolojik ya da patolojik yollarla sürekli serbest radikal oluşmaktadır. Bu serbest radikallerin oluşumunu ve bunların meydana getirdiği hasarı önlemek için birçok savunma mekanizması geliştirilmiştir. Bu mekanizmalar antioksidan savunma sistemleri olarak bilinir(72).

Antioksidanlar endojen ya da ekzojen kaynaklı olabilirler(41-43).

2.2.1.3.1. Endojen Antioksidanlar

Endojen antioksidanlar enzim ve enzim olmayanlar şeklinde ikiye ayrılır:

1. Enzim olan endojen antioksidanlar:

a- Süperoksit dismutaz (SOD): Süperoksit radikalinin hidrojen peroksit ve moleküler oksijene dönüşümünü katalizler(32).

İ/R hasarına uğrayan fleplerde enzimin seviyesinin, kullanımına bağlı olarak düştüğü gösterilmiştir(73).

b- Glutasyon peroksidaz (GSH-Px): Hidrojen peroksit ve organik hidroperoksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Membranı peroksidasyona karşı korur(35,45).

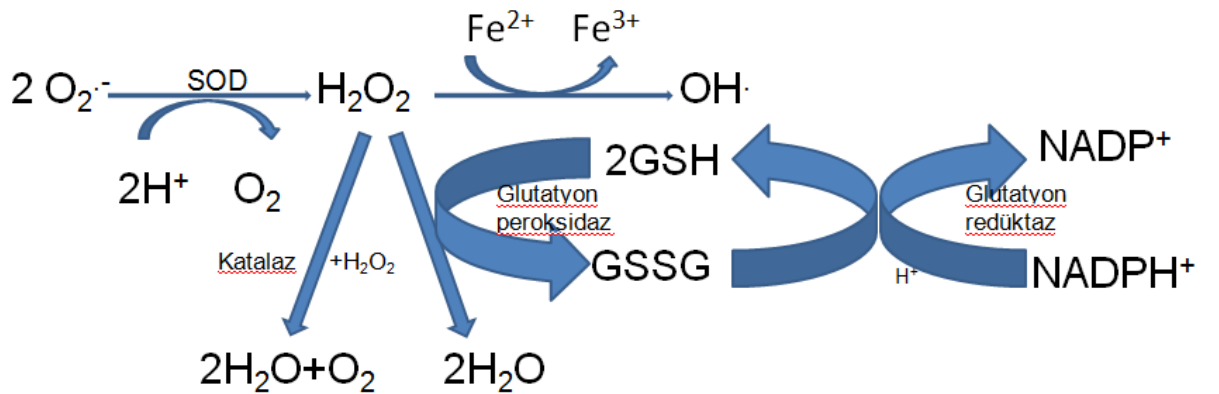
c- Glutasyon redüktaz: Hidroperoksitlerin indirgenmesi sonucu oluşan okside glutasyonun (GSSG) tekrar indirgenmiş glutatyon (GSH) dönüşümünü katalize ederler(32).

d- Glutasyon S-transferaz (GST): Lipid peroksitlerinin indirgenmesinden sorumludur(41-43).

e- Katalaz (CAT): Hidrojen peroksiti suya ve oksijene parçalar(41-43).

f- Mitokondriyal sitokrom oksidaz: Solunum zincirinin son enzimidir ve süperoksiti detoksifiye eder(41-43).

Şekil 4'de enzim olan antioksidanların reaksiyonları görülmektedir.



Şekil 4: Enzim olan endojen antioksidanların reaksiyonları

2. Enzim olmayan endojen antioksidanlar:

Melatonin, serüloplazmin, transferin, miyoglobin, hemoglobin, ferritin, bilirubin, glutatyon, sistein, metiyonin, ürat, laktoferrin ve albumindir(41-43).

2.2.1.3.2. Ekzojen Antioksidanlar

E vitamini, C vitamini, karotenoidler, folik asit, flavonoidler ve çeşitli ilaçlar ekzojen antioksidanlardır. Antioksidan ilaçlara örnek olarak allopürinol (ksantin oksidaz inhibitörüdür.), rekombinant süperoksit dismutaz, deferoksamin (demir şelatörüdür, serbest radikal süpürücü etkisi vardır.) verilebilir(41-43,74).

2.2.2. İ/R Hasarında Etkili Olan Diğer Faktörler

2.2.2.1. Nitrik Oksit (NO)

Endotel kökenli gevşetici faktör olarak da bilinen NO çeşitli hücreler tarafından üretilen, çok sayıda fonksiyona sahip olan serbest radikal bir gazdır. L-arjinin ve oksijenden nitrik oksit sentaz (NOS) enzimi ile sentezlenir. Yarı ömrü saniyelerle ölçülen labil bir gazdır(58). Bu nedenle çalışmalarda NO prekürsörleri (L-arjinin gibi) kullanılır. Ayrıca nitrik oksit sentazın kompetitif inhibitörleri de tanımlanmıştır. Bunlar içinde sıklıkla kullanılan N-nitro-L-arjinin metil esteridir (L-NAME) (11).

NOS enziminin 3 farklı izoformu mevcuttur. Tip I nöronal NOS'tur. Bu enzimin aktivitesi intrasellüler kalsiyum artışına bağlıdır. Tip II indüklenebilir NOS'tur. Pek çok hücrede bulunmasının yanı sıra inflamasyonda endotel, düz kas hücreleri ve makrofajda bulunması önem taşır. Bu enzim IL-1, TNF- α , IFN- γ (interferon gama), gram negatif bakterilerin duvarında bulunan lipopolisakkarit (LPS) tarafından oluşturulan mediatörler ve çeşitli inflamatuvar sitokinler tarafından uyarılmaktadır. Tip III endotelial NOS'tur. Aktivitesi intrasellüler kalsiyum artışına bağlıdır(58). İnflamatuvar uyarılarla indüklenebilir NOS düzeylerinin arttığı ve aşırı NO üretiminden sorumlu olduğu saptanmıştır(75).

NO'in koruyucu etkisinin yanı sıra fazla üretildiği takdirde zararlı etkileri de mevcuttur. Temel etkisi vasküler tonusun düzenlenmesi üzerinedir. Önemli bir vazodilatatördür. NO, guanil siklazı aktive eder. Guanil siklaz da siklik guanosin monofosfatı arttırarak (cGMP) damar düz kaslarında gevşemeye yani vazodilatasyona sebep olur. Antimikrobiyal etkisi vardır. Trombosit agregasyonunu baskılar(58). Ayrıca nötrofil adezyon molekülleri olan ICAM-1, E-selektin ve P-selektin ekspresyonunu azaltarak nötrofil adezyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir(76-77).

Çeşitli flep İ/R hasarı çalışmalarında NO prekürsör ya da donörleri kullanıldığında nötrofil sayısının azaldığı ve NO'in hasara karşı koruyucu etkisi olduğu gösterilmiştir. Bu etki NO kompetitif inhibitörleri kullanıldığında tersine dönmektedir(78,79). NO'in bu koruyucu etkisinin nötrofil adezyonunu inhibe etmesinden kaynaklandığı düşünülmektedir(80,81).

NO süperoksit radikali ile reaksiyona girmesi sonucu peroksinitrit (ONOO^-) oluşur. Böylece NO'in koruyucu etkileri ortadan kalkar ve toksik etkileri ortaya çıkar. Peroksinitrit direkt proteinleri hasara uğratabilir. Ayrıca hidroksil radikali (OH^\cdot), azot dioksit (NO_2^\cdot), nitronyum iyonu (NO_2^+) gibi toksik ürünlere dönüşebilir(39).

2.2.2.2. Araşidonik Asit Metabolitleri

Daha önce bahsedildiği üzere iskemide fosfolipazların aktive olması ile membran fosfolipidlerinden araşidonik asit oluşur. Araşidonik asit de lipooksijenaz ve siklooksijenaz olmak üzere iki yolla metabolize edilir(58).

Lipooksijenaz yolunun önemli ürünü LTB_4 'dür. LTB_4 güçlü kemoatraktan maddedir, nötrofil degranülasyonuna sebep olur. Ayrıca serbest radikal oluşumunu indükler(11).

Siklooksijenaz yolunun önemli ürünleri ise tromboksan A_2 ve prostosiklidir. Tromboksan A_2 güçlü bir vazokonstriktördür ve trombosit agregasyonunu indükler. Buna karşılık prostosiklin tam tersi etkilere sahiptir. Güçlü vazodilatatördür ve trombosit agregasyonunu inhibe eder(11).

Deneysel çalışmalarda prostosiklin ve prostosiklin analogu olan İloprost'un flep yaşayabilirliğini arttırdığı kanıtlanmıştır(82,83). Buna karşılık aynı etki tromboksan sentetaz inhibitörleri kullanılarak da elde edilmiştir(84).

2.2.2.3. Mast Hücreleri

Mast hücrelerinin İ/R hasarında degranüle oldukları gösterilmiştir(85,86). Mast hücreleri degranüle oldukları zaman ortama başta histamin olmak üzere proteazlar ve nötrofil için kemotaktik ajanlar salınır(87). Bu da doku hasarına neden olur. Nitekim, sıçan epigastrik ada flebinde yapılan İ/R hasarında H₁ ve H₂ reseptör blokerleri olan difenhidramin ve simetidin'in koruyucu etkileri olduğu gösterilmiştir(88).

2.2.2.4. Apoptozis

Apoptozis programlanmış hücre ölümünü tanımlar. Doku homeostazı, yani hücre yapım ve yıkımının bir düzen içinde oluşu proliferasyon/apoptozis dengesinin sağlıklı bir şekilde sürdürülmesine bağlıdır. Bu dengenin bozulması birçok önemli hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır(89).

Apoptozis fizyolojik ya da patolojik olarak ortaya çıkabilir(32). Embriyogenezde parmaklar arasındaki perdelerin ortadan kaldırılması, menstrüel siklusta endometrium hücrelerinin dökülmesi ve hasarlı DNA'ya sahip hücrelerin öldürülmesi apoptozis örnekleridir(32,90).

Genellikle tek hücre ya da hücre gruplarını kapsar. Apoptozla hücre ölümü klasik nekrozdan farklı olarak enflamasyon olmaksızın gerçekleştirilir. Apoptozda meydana gelen morfolojik değişikliklerin başında nükleer kromatinin yoğunlaşması gelir. Kromatin nükleer membranın periferinde iyi sınırlı kitleler halinde görülür. Sonunda da karyoreksize uğrar. Hücre hızla büzülür. Ardından sitoplazma ve organellerin membran ile sarılmış keselerinden oluşan apoptotik cisimler oluşur. Bu apoptotik cisimler makrofajlarca fagosite edilerek yok edilir(32).

Apoptozun düzenlenmesinde bazı genler görev alır. Örneğin bcl-2 anti-apoptotik gen, bax ise apoptotik gendir(91).

Apoptozisi tetikleyen nedenlerden biri de iskemi-reperfüzyondur. Serbest radikallerin apoptozda kilit rol oynayan kaspaz adı verilen enzimleri aktive ettiği gösterilmiştir(92). Ancak İ/R hasarında hücre ölümünde nekrozun mu yoksa apoptozisin mi etkin olduğu halen tartışmalıdır(3). İ/R hasarını önlemede apoptozisi hedef olarak seçen çalışmalar mevcuttur. Sıçanda koroner arter oklüzyonunu takiben kaspaz inhibitörü kullanılan deneysel bir çalışmada, İ/R hasarının kaspaz inhibitörü ile azaldığı gösterilmiştir(93). Anti-apoptotik gen olarak bilinen Bcl-2'nin hem iskemik hasarı hem de oksidatif hücre hasarını önlediği gösterilmiştir. Bu nedenle Bcl-2'nin İ/R hasarını önlemede kullanılabilirliği düşünülmektedir(92,94,95).

Sumer ve arkadaşlarının sıçanda fasyokutan fleplerde kaspaz inhibitörü kullanarak yaptıkları çalışmada kaspaz inhibitörünün kritik iskemi süresini anlamlı ölçüde arttırdığı saptanmıştır. Bu sonuca dayanılarak apoptozisin yumuşak doku fleplerinde İ/R hasarında önemli rol oynadığı bildirilmiştir(96).

Ancak İ/R hasarında hücre ölümünde etkin olan mekanizmanın apoptozis olmadığı, nekroz olduğunu bildiren çalışmalar da mevcuttur. Gujral ve arkadaşları sıçan karaciğerinde İ/R hasarında etkin olan hücre ölüm şeklini araştırmışlardır. 60 dakika süreyle iskemi uyguladıkları sıçanlarda reperfüzyon sonrası 1., 6. ve 24. saatlerde hematoksil-eozin, TUNEL boyaması ve kaspaz-3 aktivitesi ile apoptotik ve nekrotik hücre oranlarını belirlemişlerdir. Sonuç olarak, hepatositlerde reperfüzyon sonrası 1. saatte apoptotik hücre sayısında artış görülürken 6. ve 24. saatlerde kontrol grubundan farklı bulunmadığı saptanmıştır. Kaspaz-3 aktivitesinin ise tüm gruplarda anlamlı bir yükselme göstermediği belirlenmiştir. Buna karşılık nekrotik hepatosit oranları giderek yükselmiştir. 24 saatin sonunda ölen hücrelerin % 99'unun nekrotik, yalnızca %1'inin apoptotik olduğu saptanmıştır. Bu sonuçlara dayanarak hepatic İ/R hasarında apoptozisin önemini vurgulayan pek çok yayına karşılık (97-100) temel hücre ölüm mekanizmasının nekroz olduğu bildirilmiştir(101). Ayrıca apoptozisi İ/R hasarında hücre ölümünde etkin mekanizma olarak kabul eden yayınların bazı eksik noktalarına değinilmiştir. Bu çalışmalarda apoptotik hücre varlığını saptamak için kullanılan TUNEL yönteminin apoptozise spesifik olmadığı

nekrotik hücrelerin de TUNEL ile boyandığı gösterilmiş. Bu nedenle apoptotik hücre oranını saptarken mutlak hücre morfolojisinin de dikkate alınması gerektiği söylenmiş. Ayrıca pankaspaz inhibitörlerinin ve bcl-2'nin nekroz mekanizmalarını da inhibe ettiği söylenerek bu çalışmalarda alınan olumlu sonuçların yalnız apoptozisin önlenmesine bağlanmaması gerektiği bildirilmiştir(101,102).

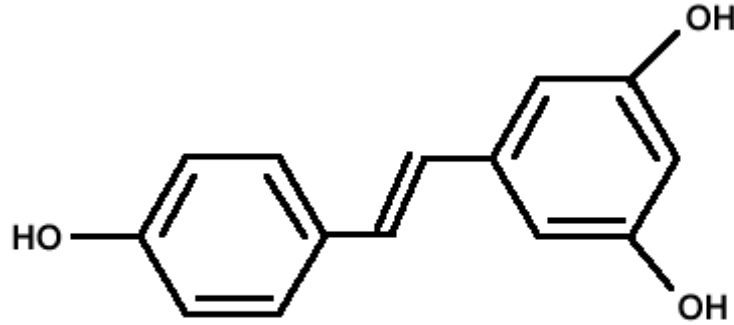
2.3. Resveratrol

Resveratrol polifenolik bir fitoaleksindir. Fitoaleksinler bitkiler tarafından dış stres ya da patojenik mikroorganizmalara maruziyet durumunda, korunma amaçlı üretilen kimyasal maddelerdir (17).

Resveratrol Japonya'da "kojoto" adı verilen ve yıllardır kullanılan geleneksel bir ilacın içinde bulunmaktaydı. Ancak resveratrol olarak keşfi 1976 yılında Langcake ve Pryce'in araştırmalarına dayanır. Langcake ve Pryce tarafından vitis vinifera (asma) bitkisinden izole edilmiştir. Bu araştırmacılar vitis vinifera bitkisinin travma, ultraviyole ışık ya da mantar saldırısına maruz kalması durumunda resveratrolü sentezlediklerini bulmuşlardır. 1992 yılında ise Siemann ve Creasy adlı araştırmacılar resveratrolün kırmızı şarap içinde bulunduğunu keşfetmiş ve Fransız paradoksundan sorumluğu olduğunu söyleyerek dikkatleri resveratrol üzerine çekmişlerdir(17). Fransız paradoksu Fransa'da yağlı diyet ve sigara tüketiminin fazla olmasına karşılık koroner kalp hastalığı insidansının düşük olmasıdır. Bu paradoksun sebebinin Fransa'da yüksek kırmızı şarap tüketimine bağlı olduğu anlaşılmıştır(12,17,103).

Resveratrol yer fıstığından , ladin ağacına, antep fıstığına kadar pek çok bitkide bulunmaktadır. En yoğun olarak bulunduğu yer üzüm kabuğudur (50-100 µg/gr). Kırmızı şaraptaki resveratrol miktarı 0.1-15 mg/lt'dir. Beyaz şarap yapımında üzüm kabukları kullanılmadığı için resveratrol miktarı kırmızı şarabın %1-5'i kadardır(17,104,105,106). Bitkilerde resveratrol sentezinin stres, enfeksiyon ve ultraviyole radyasyona maruziyet gibi durumlarda arttığı gösterilmiştir(104).

3,4',5 trihidroksistilben adı ile de bilinen resveratrolün cis ve trans izomerik formları bulunur. Ancak üzümde yalnız trans izomeri bulunduğu için çalışmalarda da daha çok bu izomer kullanılmaktadır(17).



Resveratrol

Şekil 5: Trans-resveratrolün kimyasal yapısı

Resveratrolün metabolizması oldukça hızlıdır. İnsana oral yoldan verildiğinde hızla emilir. 0.83 ila 1.5 saatte plazma pik konsantrasyonuna ulaşır ve 4 saat içinde % 77'si idrarla atılmış olur. İdrarda tespit edilen metabolitleri monosülfat, disülfat, monoglukuronid, ve glukuronid-sülfattır(107).

2.3.1. Resveratrolün Biyolojik Aktivitesi

Resveratrolün temel biyolojik aktiviteleri 7 ana başlık altında toplanabilir:

1. Antioksidan etki
2. Antiinflamatuvar etki
3. Antiagregan etki
4. Vazorelaksan etki
5. Anjiogenez üzerine etki
6. Apoptozis üzerine etki
7. Anti-kanser etki
8. Östrojen benzeri etki

2.3.1.1. Antioksidan Etki

Resveratrolün antioksidan etkisi; serbest radikal süpürücü etkisi, katalitik metal iyonlarla şelasyon yapma kapasitesi, antioksidan seviyelerini yükseltme özelliği ve indiklenebilir NOS aktivitesini baskılayabilmesine bağlıdır(17-19,110).

Düşük dansiteli lipoprotein peroksidasyonunun demir ve bakır iyonları ile arttığı bilinmektedir(108). Resveratrolün katalitik metal iyonları ile şelasyon yapma özelliği vardır(17,18). Böylece resveratrol düşük dansiteli lipoproteinlerin peroksidasyonunu azaltır. Ayrıca resveratrol serbest radikal süpürücü etkiye sahiptir. Resveratrol bu sayede membranları lipid peroksidasyonundan korur. Resveratrolün bu lipid peroksidasyonunu engelleyici etkisinin flavonoidlerden (epicatecin, catechin, quercetin) daha yüksek olduğu gösterilmiştir(17).

Serbest radikallerin DNA hasarı yaptığı bilinmektedir. Bir çalışmada resveratrolün hidroksil radikali süpürücü etkisi ile DNA kırılmalarını azalttığı gösterilmiştir(18). Bu çalışmalara karşılık resveratrolün lipid peroksidasyonu azalttığı ancak hidroksil radikal süpürücü etkisinin anlamlı olmadığını bildiren çalışma da mevcuttur(109).

Resveratrolün bu temel etkilerinin yanı sıra antioksidanların seviyelerini arttırdığını gösteren yayınlar da mevcuttur. Glutasyon peroksidaz, glutasyon redüktaz, glutasyon S-transferaz enzimlerinin ve glutasyon seviyelerinin resveratrol ile arttığı gösterilmiştir(19).

Resveratrolün LPS ile ortaya çıkarılan indüklenbilir NOS aktivitesini belirgin olarak baskılayabildiği gösterilmiştir. Böylece aşırı NO üretimi ve buna bağlı peroksinitrit oluşumu engellenmektedir(110).

2.3.1.2. Antiinflamatuvar etki

Resveratrolün antiinflamatuvar etkisi, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimini inhibe etmesi, bazı inflamatuvar sitokinleri baskılaması, endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltması ve NFκB (nükleer faktör kappa B) inhibisyonu yapmasına bağlanmıştır(111-115,117).

Resveratrolün araşidonik asit salınımını engellediği, siklooksijenaz-1 enzimini inhibe ettiği ve ayrıca siklooksijenaz-2 (COX-2) enzim indüksiyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir. Böylece araşidonik asit metabolizmasında ortaya çıkan inflamatuvar ajanların ve serbest radikallerin oluşumu resveratrol tarafından engellenmektedir(111,112). Resveratrolün siklooksijenaz yolu üzerine olan bu bilinen etkisinin yanında lipooksijenaz yolunu da inhibe ettiği, böylece bu yolda oluşan yüksek kemotaktik aktiviteye sahip ajanların ve serbest radikallerin oluşumunu da önlediği saptanmıştır(113).

Resveratrol TNF- α , interlökin 1 β ve interlökin 6 gibi inflamasyonda etkili olan sitokinleri baskılamaktadır(114).

Resveratrolün nötrofil adezyonunda önemli olan ICAM-1 ve VCAM-1 adezyon moleküllerini inhibe ettiği gösterilmiştir(115).

Birçok bileşimin, pro-inflamatuvar, karsinojenik ve büyüme modüle edici etkileri bir transkripsiyon faktörü olan nükleer faktör kappa B (NF κ B) aracılığıyla gerçekleşmektedir(116). NF κ B pek çok inflamatuvar sitokinin transkripsiyonunu modüle eder bu nedenle inflamatuvar süreçte kilit rolü vardır. Resveratrolün NF κ B aktivasyonunu inhibe ettiği ve böylece antiinflamatuvar etki gösterdiğini saptayan çalışma mevcuttur(117.)

2.3.1.3. Antiagregan Etki

Daha önce anlatıldığı üzere araşidonik asit metabolizmasında oluşan tromboksan A₂ ve prostosiklin trombositler üzerinde zıt etkilere sahiptir. Tromboksan A₂ trombosit agregasyonunu tetiklerken, prostosiklin inhibe eder(11). Trombin ve ADP ile uyarılmış insan trombositlerinin agregasyonunun resveratrol ile doz bağımlı olarak inhibe olduğu gösterilmiştir. Bu antiagregan etkiden resveratrolün tromboksan B₂ (tromboksan A₂'nin stabil metaboliti) sentezini inhibe etmesi sorumlu tutulmuştur(118).

2.3.1.4. Vazorelaksan Etki

Resveratrolün vazorelaksan etkisini hem NO bağımlı hem de NO bağımsız olmak üzere iki yolla gerçekleştirdiği saptanmıştır(119).

İnsan umbilikal ven endotel hücrelerinin kırmızı şarabın alkolik olmayan ekstreleri ile 20 saat inkübe edilmesi sonucu NO salınımının 3 kat arttığı belirlenmiştir(15). Bir çalışmada endoteli sağlam sıçan aortasında resveratrolün noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtını geri çevirdiği saptanmıştır. Resveratrolün bu gevşetici etkisinin NOS inhibitörü ile bloke olduğu tespit edilmiştir(119).

Resveratrolün NO bağımsız etkileri hangi yolla gerçekleştirdiği net değildir. cAMP ve cGMP yıkımını inhibe etmesi, guanil siklazı aktive etmesi, düz kas hücre membranı ile direkt ya da iyon kanalları yoluyla etkileşmesi öne sürülen mekanizmalardır. Resveratrolün endotel bağımsız olarak da gevşemeye neden olabileceği endoteli çıkarılmış sıçan aortasında yapılan çalışmalarda gösterilmiştir. Endoteli olmayan bu damarlarda da noradrenalin ile elde edilen kasılma yanıtının resveratrol ile geri çevrildiği saptanmıştır ve bu etki NO'den bağımsız olduğu için NOS inhibitöründen etkilenmemiştir(119).

2.3.1.5. Anjiogenez Üzerine Etki

Anjiogenez; embriyonik vasküler gelişim, yara iyileşmesi, diabetik retinopati, tümör gelişimi gibi pek çok fizyolojik ve patolojik süreçte rol oynar. Neovaskülarizasyonda pek çok anjiogenetik faktörün rol aldığı saptansa da VEGF (vasküler endotelial büyüme faktörü) bunlar içinde en etkili olanıdır(120). VEGF etkilerini endotel üzerinde bulunan VEGF reseptör tip-1 (Flt-1) ve VEGF reseptör tip-2'yi (Flk-1) kullanarak gerçekleştirir(121).

Resveratrolün anjiogenez üzerine olan etkilerini VEGF üzerinden gerçekleştirdiği gösterilmiştir. VEGF nötralize edici antikor uygulandığında resveratrol ile tetiklenen damar ağının tamamen geri döndüğü saptanmıştır(122). Buna karşılık over kanser hücrelerinde(123), dil skuamöz kanser hücrelerinde ve hepatoma hücrelerinde resveratrolün VEGF

düzelelerini azalttığı gösterilmiştir(124). Yani resveratrolün VEGF üzerinde hem aktive edici hem inhibe edici etkisi söz konusudur.

Resveratrolün VEGF üzerindeki bu bifazik etkisinin doza bağılı olduğu insan endotel hücre kültüründe gösterilmiştir. 1, 5 ve 10 µM dozlarında resveratrol VEGF ekspresyonunu artırırken, 20 ve 50 µM dozlarında ise inhibe etmiştir. Ayrıca resveratrol reseptör ekspresyonu üzerinde de bifazik etki göstermiştir. Resveratrol 5 µM dozda Flk-1 ekspresyonunu artırırken, 20 µM dozda azaltmıştır. Flt-1 ekspresyonunu ise etkilenmemiştir. Resveratrolün bu bifazik etkiyi doz bağımlı olarak anjiogenez yönetiminde etkili olan GSK3β/β-catenin/TCF yolunu modüle ederek gösterdiği saptanmıştır(122).

2.3.1.6. Apoptozis Üzerine Etki

Resveratrolün doz ve hücre tipine bağılı olarak hem anti-apoptotik hem de pro-apoptotik etki gösterdiği saptanmıştır(125,126). Kanser hücrelerinde resveratrolün apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir(127-129). Delmas ve arkadaşlarının kolon kanser hücrelerinde 10-100 µM arası değişen konsantrasyonlarda resveratrol ile yaptıkları çalışmada, resveratrolün kaspaz sistemini aktive ettiği ve apoptozisi tetiklediği gösterilmiştir(127). Buna karşılık resveratrolün oksidan stres ile tetiklenen apoptozisi azalttığına dair yayınlar da mevcuttur(130). Ungvari ve arkadaşları endotel hücre kültürü ve damar kültüründe oksidatif stresle indüklenen apoptozisin resveratrol ile doz bağımlı olarak azaldığını saptamışlardır(131).

2.3.1.7. Antikanser Etki

Resveratrolün, karsinogenezin başlangıç, ilerleme ve gelişme olmak üzere 3 temel aşamasını da inhibe ettiği saptanmıştır(111).

Resveratrol antikanser etkisini farklı birkaç mekanizma ile gösterir. Bu mekanizmalardan biri COX-2 inhibisyonudur. Bu enzimin aktivitesi tümöröenez için önemlidir. Resveratrolün insan meme ve oral epitel hücrelerinde COX-2 transkripsiyonunu ve COX-2 aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir(132).

Resveratrolün, ribonükleotid redüktazı inhibe ederek kansere karşı etkili olduğu belirtilmektedir. Bu enzim, DNA sentezi için gerekli olan deoksiribonükleotidleri sağlar. Resveratrol ise bu enzimi inhibe ederek, antiproliferatif aktivite gösterir ve böylece kanser hücresi proliferasyonunu inhibe eder. Fare lösemi hücrelerinde resveratrolün ribonükleotid redüktazı inhibe ettiği gösterilmiştir(133).

Ayrıca resveratrolün, arilhidrokarbonları genotoksik metabolitlere metabolize eden enzimleri (sitokrom p450) inhibe ederek(134), faz 2 ilaç metabolizmasını indükleyerek, hücre diferansiyasyonunu artırarak ve indüklenebilir NOS'u baskılayarak antikanser etki gösterdiği saptanmıştır(135).

2.3.1.8. Östrojen Benzeri Etki

Trans resveratrol ve dietilstilbesterol yapıca benzerdir. Resveratrol östrojen reseptörüne bağlanmak için östrojen ile yarışır. Bu nedenle fitoöstrojen olarak da bilinir. Resveratrolün kardiyoprotektif özelliğinde bu östrojen benzeri etki göstermesinin de katkısı olabileceği söylenmiştir(136).

Ancak resveratrolün bu östrojen benzeri etkisi östrojen sensitiv tümörlerde tümör proliferasyonuna sebep olmuştur(136). Buna karşılık yüksek dozda resveratrolün östrojen sensitiv tümörde antagonist etki gösterdiğini saptayan çalışma da mevcuttur(137). Resveratrolün hangi mekanizma ile bu bifazik etkiyi gösterdiği bilinmemektedir.

2.3.2. Resveratrolün Yan Etkileri

Resveratrolün yan etkilerini araştırmak amacı ile yapılan çalışmalarda resveratrolün prooksidan bir ajan olarak davranabileceği saptanmıştır(138). Bu prooksidan özellik karaciğer İ/R hasarı çalışmasında gösterilmiştir. Bu çalışmada resveratrol 0.02, 0.2, 2 ve 20 mg/kg olmak üzere 4 farklı dozda uygulanmıştır. Düşük dozda resveratrol uygulamasının sitoprotektif olduğu saptanırken, 20 mg/kg dozda resveratrol enjeksiyonunun İ/R uygulanan karaciğerde hasarı arttırdığı ve yüksek dozda resveratrolün bir prooksidan madde gibi davrandığı saptanmıştır. Ancak İ/R uygulanmayan sham

grubunda aynı yüksek dozda resveratrolün prooksidan etki göstermediği görülmüştür(139).

Juan ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sıçanlara 28 gün süre ile oral yolla günlük 20 mg/kg dozda resveratrol verilmiş ve ılımlı aspartat aminotransferaz yüksekliği dışında herhangi bir yan etki gözlenmediği bildirilmiştir(140).

Crowell ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada sıçanlara 4 hafta süre ile oral yolla günlük 300, 1000 ve 3000 mg/kg resveratrol verilmiş ve kontrol grubu ile kıyaslanmıştır. 3000 mg/kg doz verilen grupta total vücut ağırlığı ve yemek tüketiminde azalma görülmüştür. Laboratuvar testlerinde üre, kreatinin, alkalin fosfotaz, alanin aminotransferaz, bilirubin, albumin ve lökosit seviyelerinde yükselme görülürken, hemoglobin, hematokrit ve eritrositte düşme saptanmıştır. Yapılan histopatolojik incelemede ciddi nefropati bulguları ve karaciğer ağırlığında artış saptanmıştır. 1000 mg/kg resveratrol verilen grupta kilo almada azalma ve lökosit seviyesinde yükselme görülmüştür. 300 mg/kg doz verilen grupta ise herhangi bir yan etki saptanmamıştır(141).

Boocock ve arkadaşlarının Resveratrol ile 40 gönüllü üzerinde faz 1 çalışması yapmışlardır. Bu çalışmada 4 gruba ayırdıkları gönüllülere oral olarak tek doz 0.5, 1, 2 ya da 5 g resveratrol verip yan etkileri araştırmışlardır. 2 gönüllüde saptanan bilirubin ve alanin aminotrasferaz yüksekliği dışında ciddi bir yan etki ile karşılaşmadığı bildirilmiştir(107).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

3. 1. Deneysel Hayvanları

Deneysel, Ege Üniversitesi Hayvan Deneysel Yerele Etik Kurulu onayı (tarih:25/12/2009 sayı:2009-170) alındıktan sonra ağırlıkları 250-300 g arasında değişen 21 Wistar tür sıçan üzerinde gerçekteşirildi.

3.2. Deneysel Grupları

Sıçanlar randomize olarak 3 gruba ayrıldı(Tablo 1).

Tablo 1: Deneysel grupları

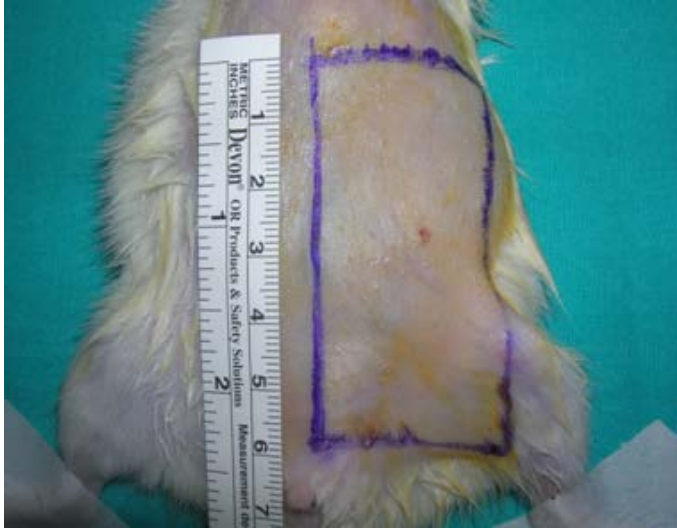
Gruplar	Sayı	Yapılan işlem + Uygulanan ilaç
Grup 1 Sham grubu	7	İnferior epigastrik flep kaldırıldı ve herhangi bir işlem uygulanmadan flep yerine iade edildi.
Grup 2 İ/R grubu	7	İnferior epigastrik flep kaldırıldı. 8 saat iskemi ve ardından reperfüzyon uygulandı.
Grup 3 İ/R+res grubu	7	İnferior epigastrik flep kaldırıldı. İskemiden 15 dakika önce 5 mg/kg dozda resveratrol intraperitoneal yolla verildi. 8 saat iskemi uygulandıktan sonra reperfüzyondan hemen önce resveratrol dozu tekrarlandı.

3.3. Deneysel İşlemler

Deneysel işlemler Ege Üniversitesi Deneysel Cerrahi Merkezi'nde gerçekteşirildi. Hayvanlara anestezi ajan olarak 20 mg/kg xylazin ve 100 mg/kg ketamin intraperitoneal yolla verildi. Sıçanlar supin pozisyonda iken ekstremitelele zeminde bant ile tespit edildi. Operasyon bölgesi tıraş edildikten sonra povidon iyot emdirilmiş steril gazlı bez ile temizlendi. Deneşlelerin tümünde Bayramiçli tarafından tanımlandığı üzere inferior epigastrik flep planlandı(142).

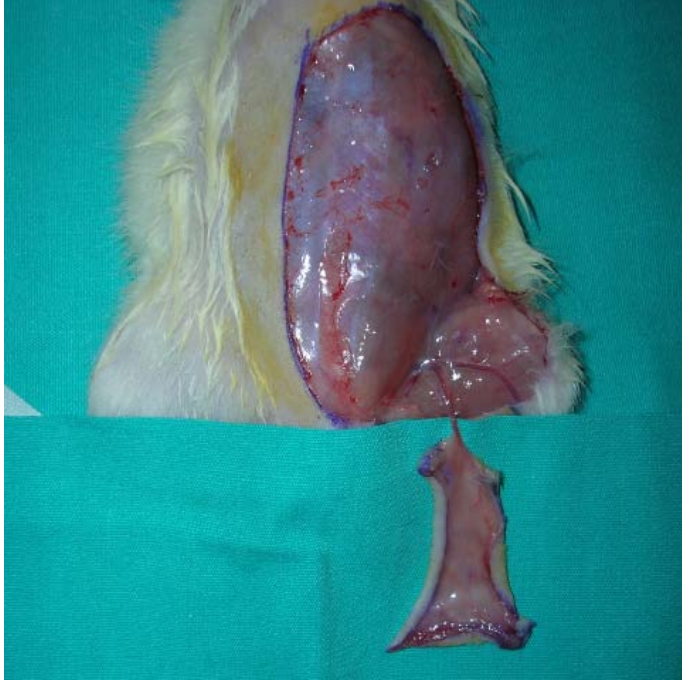
İnferior epigastrik flep ya da diğer adı ile kasık flebi ilk kez 1967'de Strauch ve Murray tarafından tanımlanmıştır. Flebin damar anatomisi Petry ve

Wortham tarafından 1984'de ortaya konulmuştur. İnfierior epigastrik flep, femoral arterin dalı olan yüzeyel infierior epigastrik arter tarafından beslenir. Flebin sınırlarını yukarıda kosta kavsi, aşağıda inguinal ligaman, medialde ksifoid ile pubisten geçen karın orta hattı ve lateralde aksiler çizgi belirler. Çeşitli çalışmalarda 2X4 cm'den 7X3.5 cm'ye kadar değişen farklı boyutlarda flepler tanımlanmıştır. Flebin boyutları çalışmanın gereklerine göre ayarlandığı için standart ölçüler yoktur(142). Bu çalışmada kullanılan sıçan ağırlıkları göz önüne alınarak, tanımlanan anatomik sınırlar içerisinde kalan 6X3 cm boyutlarında flep hazırlanmasına karar verilmiştir (Resim 1).



Resim 1: İnfierior epigastrik flep dizaynı

Planlamaya uygun çizimler yapıldıktan sonra flep derin planda kas üzerinden kasık yağ yastığı dahil edilerek kraniyalden kaudale doğru eleve edilmeye başlandı. Kaudalde epigastrik pedikül serbestlendikten sonra kaudal kenar kesisi uygulandı. Böylece flep yalnız yüzeyel infierior epigastrik arter tarafından beslenen ada flebi haline getirildi. Tüm deneklerde bu flep standardize edildi (Resim 2).



Resim 2: İnförör epigastrik arter ada flebi

Grup 1'de (sham) yalnızca cerrahi işlem gerçekleştirildi, İ/R uygulanmadan flepler yerine absorbe olmayan 4/0 bir dikiş materyali ile sütüre edildi (Resim 3).



Resim 3: Flebin yerine iade edilmesi

Grup 2'de (İ/R) ada flebi kaldırıldıktan sonra iskemi uygulamak amacı ile pediküle mikrovasküler klemp yerleştirildi. Sıçanlardaki mikrocerrahi çalışmalarında endotel hasarı yapmadan kan akımını durduracak güvenli basınç miktarı 10-30 gram/mm² olarak belirlenmiştir(143). Bu çalışmada epigastrik arter ve vene bu özellikleri taşıyan Insto marka A3 mikrovasküler klemp uygulandı (Resim 4). Klembin pediküle yerleştirilmesinin ardından flepler yerine absorbe olmayan 4/0 bir dikiş materyali iade edildi. Sıçanlar 8 saat iskemiye maruz bırakıldı. Sekiz saatin bitiminde sıçanlara tekrar anestezi verildi. Yalnız flebin kaudalinde bulunan sütürler alınarak klembe ulaşıldı. Klemp çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Klemp çıkarıldıktan sonra reperfüzyonun gerçekleştiği cerrahi lup altında doğrulandı. Flep kaudali tekrar 4/0 absorbe olmayan bir dikiş materyali ile onarıldı.



Resim 4: Mikrovasküler klemp uygulaması

Grup 3'de (İ/R+res) inferior epigastrik flep kaldırıldı. İskemiden 15 dakika önce 5 mg/kg dozda resveratrol (Sigma Chemicals, St Louis, MO, USA) intraperitoneal yolla verildi. Resveratrol üretici firmanın önerisi doğrultusunda % 0.5'lik etil alkol içinde çözülerek hazırlandı. Epigastrik arter ve vene Insto marka A3 mikrovasküler klemp uygulandı. Flepler yerine iade edilip 8 saat iskemiye maruz bırakıldı. Sekiz saatin bitiminde sıçanlara tekrar anestezi verildi. Reperfüzyondan hemen önce 5 mg/kg resveratrol dozu intraperitoneal yolla tekrarlandı. Yalnız flebin kaudalinde bulunan sütürler alınarak klembe ulaşıldı. Klemp çıkarılarak reperfüzyon sağlandı. Reperfüzyon cerrahi lup kullanılarak doğrulandı. Flep kaudali tekrar 4/0 absorbe olmayan bir dikiş materyali ile onarıldı.

Grup 1'de (sham) postoperatif 24. saatte, grup 2 (İ/R) ve grup 3'de (İ/R+res) ise reperfüzyon sonrası 24. saatte, sıçanlara tekrar anestezi verildi. Tüm fleplerin ortasından histolojik değerlendirme için 5X5 mm boyutlarında, tam kalınlıkta örnek alındı. Biyopsi yeri 4/0 absorbe olmayan bir dikiş materyali ile onarıldı.

Postoperatif 7. günde sıçanlara tekrar anestezi verildi. Tüm flepler dijital fotoğraf makinası ile görüntülendi. Histolojik değerlendirme için nekroz gelişmeyen fleplerin ortasından, nekroz gelişen fleplerin ise sağlam ve nekroze alanlarını içerecek şekilde, 10X10 mm boyutlarında, tam kalınlıkta örnek alındı.

Deney bitiminde sıçanlara, anestezi altında yapılan servikal dislokasyon yöntemi ile ötenazi uygulandı.

3.4. Deney Hayvanlarının Bakımı

Sıçanlar 20±2 santigrat derece oda ısısında, %55±10 nem oranına sahip ortamda, 12 saat aydınlık-12 saat karanlık ritmi uygulanarak barındırıldı. Sıçanlar kafeslere tek tek yerleştirildi ve çeşme suyu ve standart kemirgen yemine istedikleri zaman ulaşabilmeleri sağlandı. Anestezi esnasında sıçanlar oda havası soludu. Operasyon bitiminde operasyon bölgesine povidon iyot ile pansuman yapıldı. Hayvanlarda otokanibalizasyonu (öze dönük yamyamlık) önlemek amacı ile koruyucu yelek kullanıldı. Hayvanlar

günde bir defa sağlık parametrelerindeki değişiklikler açısından değerlendirildi.

3.5. Değerlendirmeler

3.5.1. Yaşayan Flep Oranının Değerlendirilmesi

Fleplerde canlı ve cansız dokuların kesin biçimde ayırt edebilmesinin 5-7 gün sonra mümkün olacağı saptanmıştır(144). Bu nedenle çalışmamızda fleplerde yaşayan flep oranı 7. günde değerlendirildi. Tüm flepler dijital fotoğraf makinası ile postoperatif 7. günde görüntüldü. Elde edilen fotoğraflarda yaşayan flep oranını hesaplayabilmek için Adobe Photoshop CS4 programı kullanıldı. İlgili fotoğraf Photoshop programında açıldıktan sonra fotoğrafta serbest çizim (lasso tool) fonksiyonu kullanılarak önce tüm flep alanı seçildi. Analysis bölümündeki sekmelerden record measurements fonksiyonu ile seçili alanın ölçümü pixel değeri olarak saptandı. Ardından yaşayan flep bölümü serbest çizim fonksiyonu ile belirlendi. Aynı basamaklar bu alan için de uygulandı ve böylece yaşayan flep alanı da pixel değeri olarak hesaplandı. Ardından yaşayan flep alanı tüm flep alanına bölünüp 100 ile çarpılarak yaşayan flep yüzdesi hesaplandı.

3.5.2. Histolojik Değerlendirme

Her bir gruptan alınan örnekler direkt %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 24-48 saat süre ile tespit edildikten sonra rutin parafin takip işlemine tabi tutuldu. Alınan kesitler dokunun morfolojisini incelemek amacıyla hematoksilin-eozin ile boyandı. Diğer kesitlerde erken dönemde IL-1 β ve TNF- α , geç dönemde ise VEGF ve VEGF reseptörleri olan Flk-1 ve Flt-1 dağılımları indirekt immunoperoksidaz tekniği ile incelendi. Geç dönem apoptotik hücre varlığı ise TUNEL yöntemi ile araştırıldı.

3.5.2.1. Parafin Doku Takibi

Tespit edilen örnekler, fiksatiflerin uzaklaştırılmaları amacıyla 1 gece akar su altında yıkandıktan sonra, dehidratasyon amacıyla 15'er dakika %60'dan

%95'e artan etil alkol serilerinden geçirildi. Ardından 15 dakika 1:1 oranında ksilen-alkol karışımına ve şeffaflaştırma amacıyla 15'er dakika iki değişim ksilene tabi tutuldu. 60°C'lik etüv içerisinde 15 dakika 1:1 oranında ksilen - parafin uygulanıp 30'ar dakika parafin ile immersiyonu sağlandıktan sonra dokular parafin bloklar içerisine gömüldü (Tablo 2).

Tablo 2: Parafin doku takibi

İşlem	Madde	Süre
Tespit	%10 formalin,	24 saat-48 saat
Fiksatifin uzaklaştırılması	Akar su	1 gece
Dehidratasyon	% 60 etil alkol	15 dakika
	% 70 etil alkol	15 dakika
	% 80 etil alkol	15 dakika
	% 95 etil alkol	15 dakika
	% 95 etil alkol	15 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen – Alkol	15 dakika
	Ksilen	15 dakika
	Ksilen	15 dakika
Emdirme %60 C etüv	Ksilen parafin	15 dakika
	Parafin	30 dakika
	Parafin	30 dakika
Gömme	Parafin	

3.5.2.2. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Rotary mikrotom (RM 2135, Leica) aracılığı ile alınan 5'lik parafin kesitler deparafinizasyon işlemi için 1 gece 60°C'lik etüvde bırakıldıktan sonra, 30'ar dakikalık iki değişim ksilene tabi tutuldu. Ardından rehidratasyon işlemi için %95'den %60'a azalan oranlarda alkol serilerinden geçirilen kesitler 5 dakika akar su altında yıkandı. 2 dakika hematoksilen (01562E, Surgipath, Bretton, Peterborough, Cambridgeshire) ile boyamanın ardından, fazla boyanın dokudan uzaklaştırılması için 5 dakika akar suda yıkama yapıldıktan sonra sırasıyla %80 ve %95'lik alkol serilerinde geçirilip havada

kurutulan kesitler şeffaflaştırma amacıyla 30'ar dakika iki değişim ksilende tutulduktan sonra entellan (UN 1866, Merck, Darmstadt, Germany) ile kapatıldı (Tablo 3).

Tablo 3: Hematoksilen-Eozin Boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Boyama	Hematoksilen	2 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
Diferansiyasyon	Asit alkol	2-3 saniye
Boyama	Eosin	1 dakika
Yıkama	Akar su	5 dakika
	% 80 alkol	1 dakika
	% 95 alkol	1 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	1 saat
Kapama	Entellan	

3.5.2.3. İndirek İmmunohistokimya Boyaması

Kesitleri immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile rehidratasyon sağlanarak distile suda 5 dakika bekletildi. Pap pen (IM-3580, Beckman Coulter, Marseilla, Fransa) ile sınırlandırılan % 0,5'lik tripsin solüsyonu içinde oda sıcaklığında 15 dakika tutulan kesitlere, doku endojen peroksidazını inhibe etmek amacıyla 5 dakika %3'lük H₂O₂ uygulandı. 3 defa

5'er dakika PBS ile yıkanan kesitler 1 saat bloklama solusyonu (85-9043, Invitrogen) ile muamele edildi. Bloklama solusyonu dokudan uzaklaştırıldıktan sonra primer antikolar anti-TNF- α (sc-7317, Santa Cruz), anti-IL-1 β (sc-7884, Santa Cruz), anti-VEGF (sc-7269, Santa Cruz), anti-Flk-1 (sc-6251, Santa Cruz) ve anti-Flt-1 (ab2350, Abcam) ile bir gece inkübe edildi. Ertesi gün tampon solüsyonu ile 3 defa yıkanan kesitler, biotinylated anti-mouse ve anti-rabbit, conjugated streptavidin-horse radish peroxidase solüsyonları ile (85-9043, Invitrogen) 30'ar dakika boyandı. Her bir ikincil antikor 3 defa 5'er dakika tampon solüsyonu ile yıkandı. İmmunohistokimyasal reaksiyonun görünürlüğünü saptamak amacıyla kesitler diaminobenzidine (DAB) ile 5 dakika boyandı. Mayer's hematoxilen (72804E, Microm, Walldorf, Germany) ile artalan boyaması sağlandıktan sonra distile su ile 10 dakika yıkanan kesitler kapatma medyumunu (H701, CC/Mount, Universal Phosphatase Kit, Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA, USA) ile kapatıldı (Tablo 4).

İmmunohistokimyasal değerlendirme iki farklı histolog tarafından ayrı zamanlarda incelenerek negatif (-), çok zayıf (-/+), zayıf (+), orta (++) ve şiddetli (+++) olarak değerlendirildi.

Tablo 4: İndirek immunohistokimyasal boyama

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	%3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Bloklama	Blok solusyonu	1 saat
Antikor ile inkübasyon	anti-TNF- α , anti-IL-1 β , anti-VEGF, anti-Flk-1, anti-Flt-1	18 saat, 4° de
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Biotinlenmiş ikincil antikor	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Streptavidin kompleksi	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB	5 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zıt Boyama	Mayer hematoksilen	5 dakika
Yıkama	Distile su	3x5 dakika
Kapama	Kapatma solüsyonu	

3.5.2.4. TUNEL Boyaması

Kesitler immunohistokimyasal boyama için bir gece 60 C°'lik etüvde tutulduktan sonra, 30'ar dakika iki saat değişim ksilen ile şeffaflaştırma işlemi gerçekleştirildi. Ardından %95'ten %60'a azalan derecede alkol serileri ile

rehidratasyon sağlanarak distile su ve arkasından 2 değişim PBS ile yıkandı. Kesitlerde apoptotik hücrelerin belirlenmesi için TACS 2 TDT DAB In Situ Apoptosis Dedection Kit (4810-30, Trevigen) kullanıldı. Dokular daha sonra 50 ul Proteinaz K solusyonu ile 15-30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi. Daha sonra 2 defa 2'şer dakika distile su ile yıkanan kesitler, 5 dakika Quenching solusyonu (1:10 methanol içinde %30 Hidrojen Peroksit) içinde bekletildi. PBS ile yıkanan kesitler 5 dakika TDT Labeling Buffer solusyonu ile inkübe edildi. Daha sonra 50 ul Labeling Reaction karışımı ilave edildikten sonra 60 dakika 37 ° C'de humidity chamberde inkübe edildi. Kesitler 5 dakika TDT Stop Buffer ile yıkandı. 2 defa distile sudan geçirildikten sonra Strep –HRP solusyonu ile 10 dakika 37 derecede inkübe edildi. PBS ile 2 defa 2 dakika yıkanan kesitler DAB solüsyonu ile 5 dakika boyandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra Mayer's Hematoksilen ile 3 dakika boyandı. Kesitler distile su ile yıkandıktan sonra ,%70, % 95 ve %100'lük alkol ve ardından ksilenden geçirildi. Kapatım vasatı ile kapatılan kesitler Olympus BX40 ışık mikroskobu ile incelendi(Tablo 5).

Tablo 5: TUNEL boyaması

İşlem	Madde	Süre
Deparafinizasyon	60°C etüvde	1 gece
Deparafinizasyon	Ksilen	30 dakika
	Ksilen	30 dakika
Rehidratasyon	% 95 alkol	2 dakika
	% 80 alkol	2 dakika
	% 70 alkol	2 dakika
	% 60 alkol	2 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Dokuların etrafını çizme	Dakopen	
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Proteinaz K solusyonu	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	% 3'lük hidrojen peroksit	5 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Tamponlama	Equilibration tampon sol.	5 dakika
Primer antikor	Enzim solusyonu	37°C 1 saat
Yıkama	Quenching solüsyonu	10 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
	Anti-digoxigenin konjugat	30 dakika
Yıkama	PBS	3x5 dakika
Boyama	DAB boyası	10 dakika
Yıkama	Distile su	10 dakika
Zit boyama	Mayer hematoksilen	4 dakika
Dehidratasyon	%80- %90'lık alkol serileri	2 dakika
Şeffaflaştırma	Ksilen	30 dakika
Kapama	Entellan	

3.5.3. İstatistiksel Değerlendirme

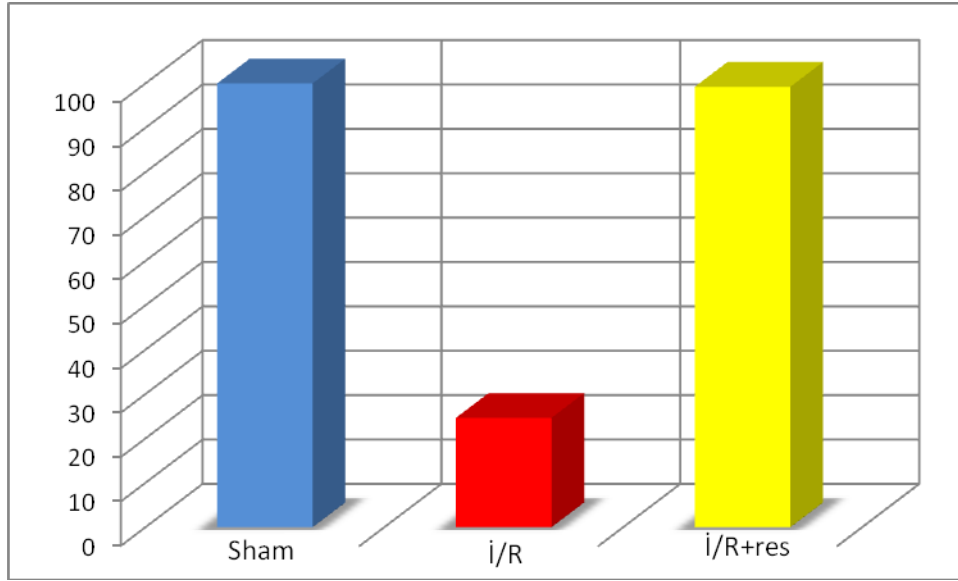
Parametrik koşullar sağlanamadığından 3 grup arasındaki ortalamaların farkına Kruskal-Wallis testi ile bakılmıştır. Post hoc test olarak Mann-Whitney U testi kullanılmıştır. P değeri < 0.01 olduğunda istatistiksel olarak fark anlamlı kabul edilmiştir.

4. BULGULAR

4.1. Yaşayan Flep Oranı

Yaşayan flep oranlarının değerlendirilmesi sonucunda ortalama yaşayan flep oranlarının sham grubunda % 100±0,00 , İ/R grubunda % 24,65±6,28 , İ/R+res grubunda % 99,25±1,96 olarak saptanmıştır (Tablo 6).

Tablo 6: Grupların ortalama yaşayan flep oranları



Çalışmada yer alan tüm sıçanların postoperatif 7. günde hesaplanan yaşayan flep oranları tablo 7’de sunulmuştur.

Tablo 7: Yaşayan flep oranları

Grup	1	2	3	4	5	6	7	Ortalama
Sham	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100	%100±0,00
İ/R	%27,64	%34,45	%17,86	%26,13	%17,94	%19,91	%28,65	%24,65±6,28
Res	%100	%100	%100	%94,80	%100	%100	%100	%99,25±1,96

Yaşayan flep oranlarının yapılan istatistiksel değerlendirmesinde 3 grup arasında fark istatistiksel olarak anlamlı bulunmuştur ($p < 0.01$) (Tablo 8). Gruplar arasındaki farkın saptanması amacı ile yapılan istatistiksel

değerlendirmede İ/R ve İ/R+res grupları arasında anlamlı fark saptanmıştır (p< 0.01) (Tablo 9).

Tablo 8: 3 grup arasında yapılan istatistiksel değerlendirme
Kruskal-Wallis Test

Ranks

Grup	N	Mean Rank
Yaşayan flep oranı Sham	7	15,00
İ/R	7	4,00
İ/R+res	7	14,00
Total	21	

Test Statistics(a,b)

	Yaşayan flep oranı
Chi-Square	17,619
Df	2
Asymp. Sig.	,000

a Kruskal Wallis Test

b Grouping Variable: grup

Tablo 9: İ/R İ/R+res grupları arasında yapılan istatistiksel değerlendirme
Mann-Whitney Test

Ranks

Grup	N	Mean Rank	Sum of Ranks
Yaşayan flep oranı İ/R	7	4,00	28,00
İ/R+res	7	11,00	77,00
Total	14		

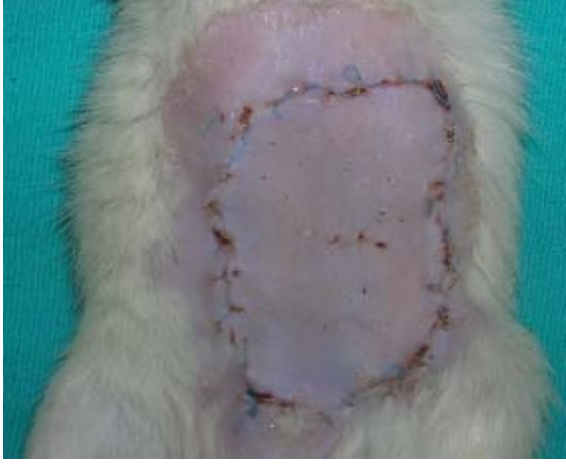
Test Statistics(b)

	Yaşayan flep oranı
Mann-Whitney U	,000
Wilcoxon W	28,000
Z	-3,258
Asymp. Sig. (2-tailed)	,001
Exact Sig. [2*(1-tailed Sig.)]	,001(a)

a Not corrected for ties.

b Grouping Variable: grup

Resim 5, 6 ve 7'de her 3 gruptan bir sıçanın postoperatif 7. günde çekilen fotoğrafı bulunmaktadır.



Resim 5: Sham grubundan bir örnek



Resim 6: İ/R grubundan bir örnek

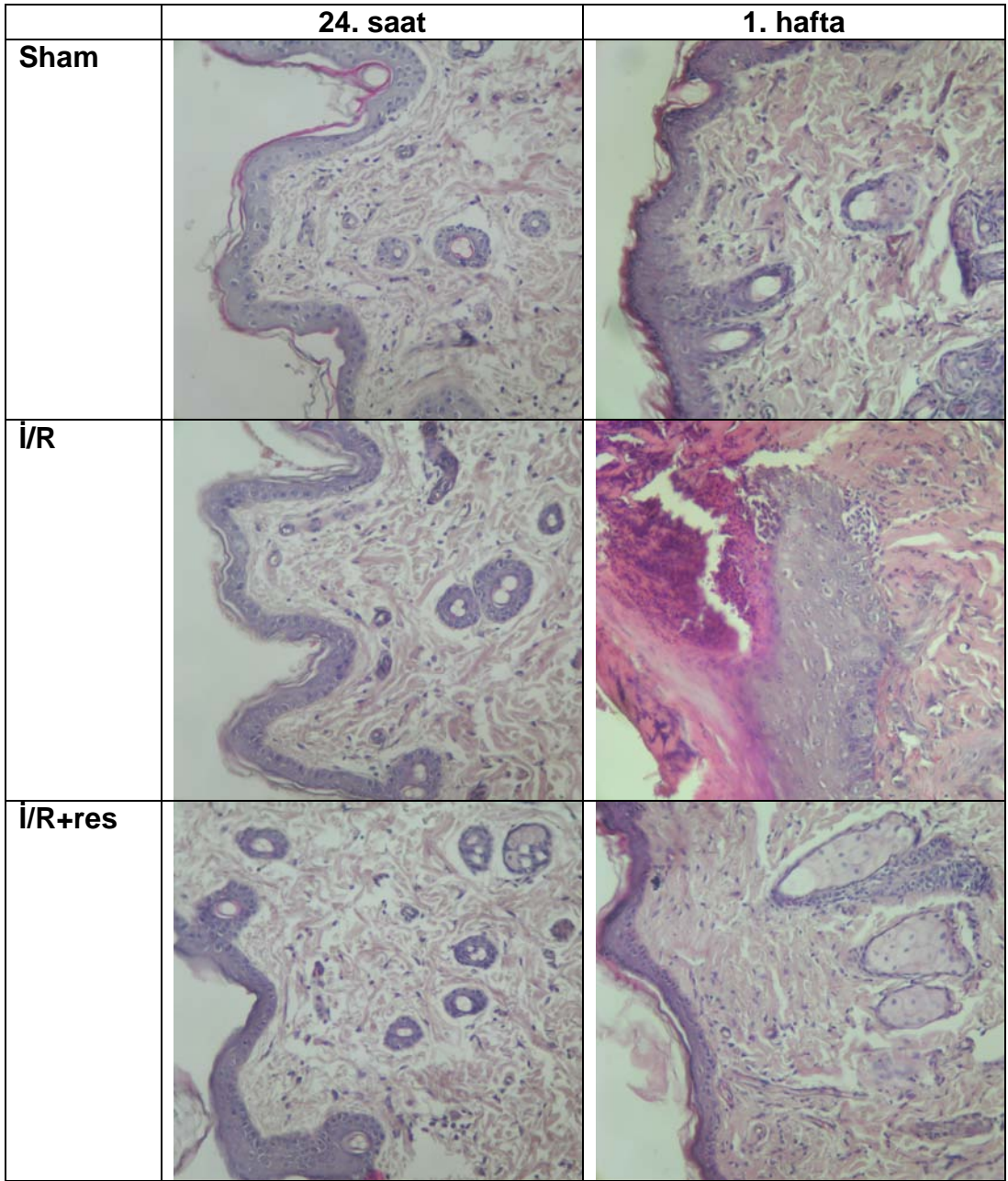


Resim 7: İ/R+res grubundan bir örnek

4.2. Histolojik Değerlendirme

4.2.1. Hematoksilen-Eozin Boyaması

Hematoksilen ve eozin boyaması sonucunda 24 saat sonunda alınan örneklerde sham, İ/R ve İ/R+res gruplarında örneklerde keratinize çok katlı yassı epitel yapısının korunduğu, alttaki bağ dokusunda kollajen liflerin dağılımlarının, bağ dokusu hücrelerinin varlığının normal yapıda olduğu, deri eklerinin (kıl folikülü, yağ bezleri) normal yapıda yer aldığı, bununla beraber polimorf nüveli lökosit (PNL) infiltrasyonunun olmadığı gözlemlendi. 1. hafta sonunda alınan örneklerde ise sham grubunda epitel yapısının korunduğu, fakat bağ dokusunu oluşturan kollajen liflerin yoğunluğunun bir miktar arttığı gözlenirken, hücresel açıdan farklılık olmadığı izlendi. İ/R grubunda ise epiderminin kaybı ile birlikte yoğun PNL infiltrasyonu, trombosit ve fibrin pıhtısını içeren eksudanın oluşumu gözlemlendi. Altta epiderminin devam ettiği, deri eklerinin ve derminin korunduğu izlendi. Bununla beraber alttaki bağ dokusunun daha sık bir yapıda olduğu izlendi. İ/R+res grubunda ise 1. haftanın sonunda epitel ve bağ dokusuna ait kısımların normal yapılarını korunduğu, fakat bağ dokusunun gevşek yapısının bir miktar sıkı görünümlü olduğu izlendi. PNL infiltrasyonunun olmadığı görüldü. Gruplara ait hematoksilen-eozin boyaması örnekleri resim 8'de sunulmuştur.



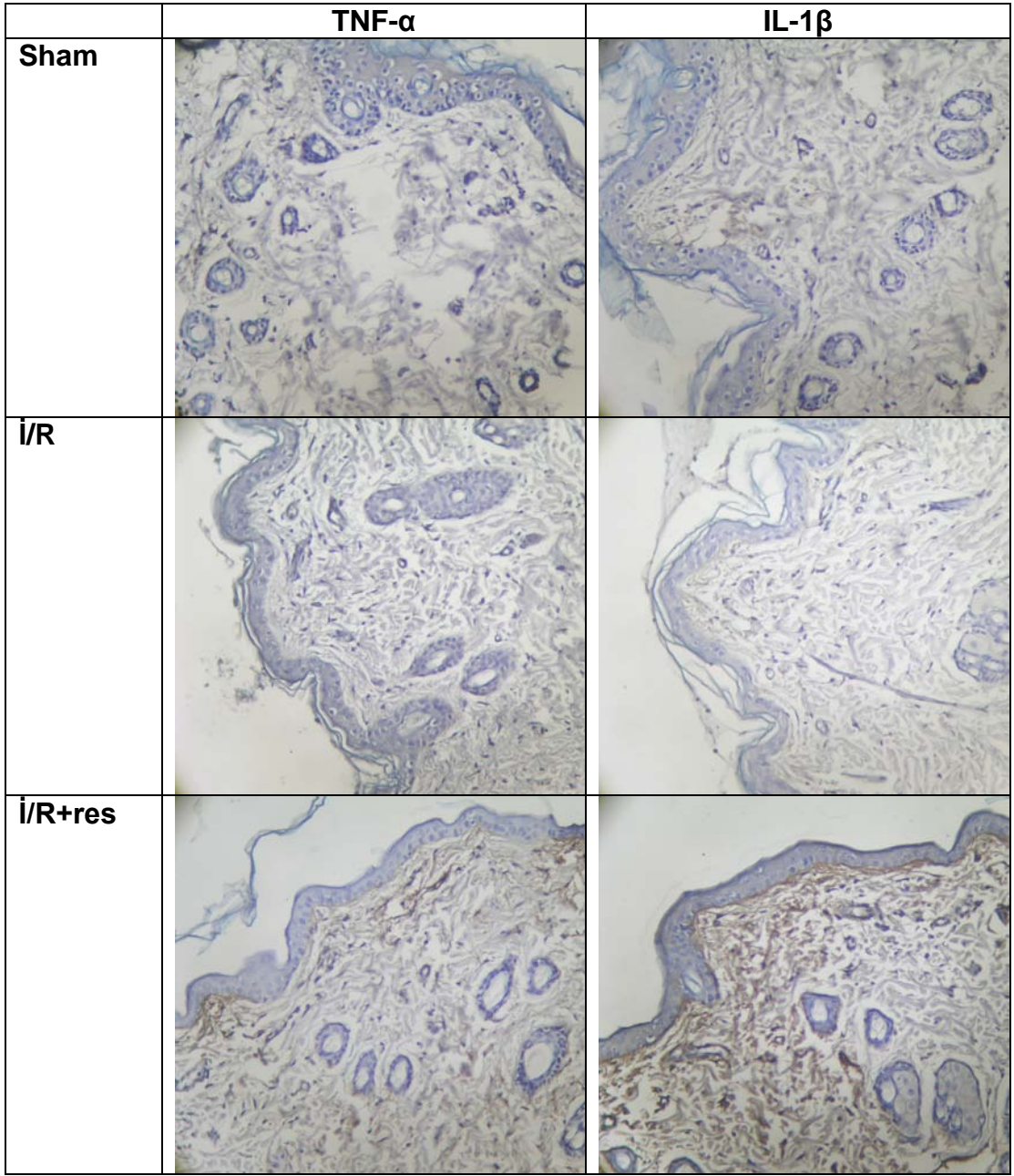
Resim 8: Gruplara ait Hematoksilen-Eozin boyaması örnekleri. X200.

4.2.2. İndirek İmmunohistokimya Boyaması

Reperfüzyon sonrası 24. saatte tüm gruplardan alınan örneklerde, immunohistokimyasal analiz sonucunda sham grubunda hem TNF- α , hem de IL-1 β immunoreaktivitelerinin hem epidermis, hem de demide negatif olduğu gözlenirken, İ/R uygulanan grupta TNF- α immunoreaktivitesinin çok zayıf (+/-), yer yer ise zayıf (+) şiddette olduğu izlendi. Aynı grupta IL-1 β immunoreaktivitesinin ise çok zayıf şiddette (+/-) olduğu ve TNF- α immunoreaktivitesine oranla daha az olduğu saptandı. İ/R+res grubunda ise TNF- α immunoreaktivitesinin zayıf (+) şiddette olduğu görülür iken, IL-1 β immunoreaktivitesinin ise çok zayıf (+/-), yer yer ise zayıf (+) şiddette olduğu izlendi. Hem TNF- α hem de IL-1 β bağ dokusunda pozitifdi. Tablo 10'da tüm grupların karşılaştırmalı sonuçları gösterilmiştir. Gruplara ait TNF- α ve IL-1 β immunoreaktivitelerinin dağılımını gösteren histolojik kesitler resim 9'da sunulmuştur.

Tablo 10: Tüm gruplara ait örneklerde TNF- α ve IL-1 β dağılımlarının immunohistokimyasal olarak karşılaştırılmalı sonuçları

	Sham	İ/R	İ/R+res
TNF-α	-	+/- yer yer +	+
IL-1β	-	+/-	+/- yer yer +

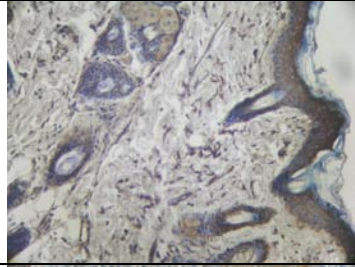
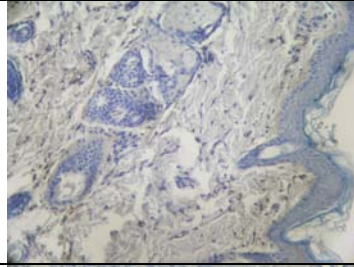
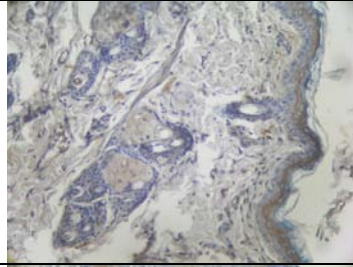
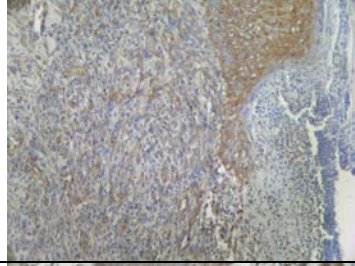
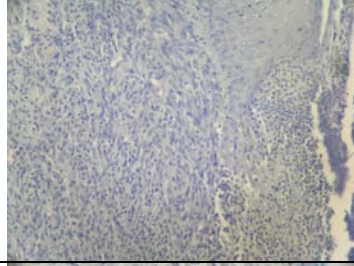
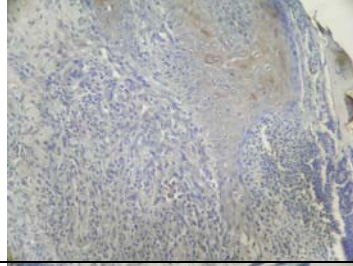
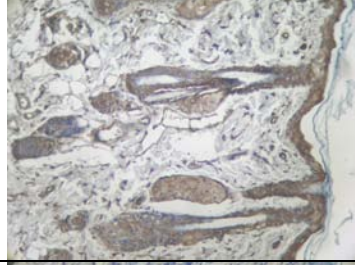
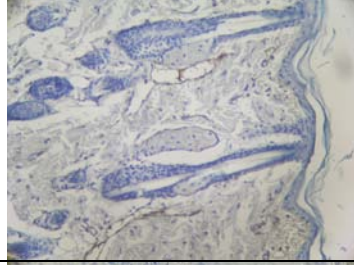
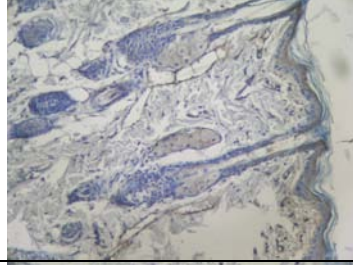
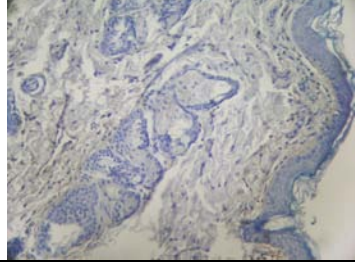
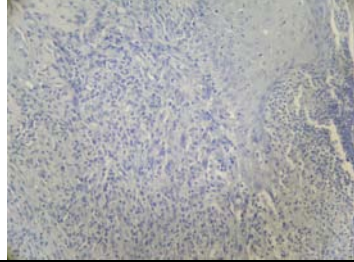
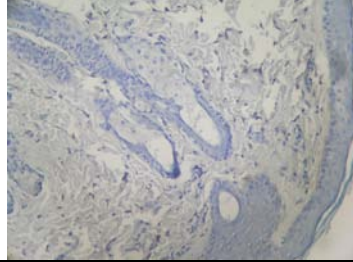


Resim 9: Gruplardaki TNF- α ve IL-1 β 'nin immunoreaktivitelerinin dağılımı.
X200

1. hafta sonunda alınan örneklerde sham grubunda VEGF immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) , Flk-1 immunoreaktivitesinin çok zayıf şiddette (+/-), Flt-1 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette (+) olduğu gözlemlendi. İ/R grubunda ise VEGF immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) , yer yer ise kuvvetli (+++) olduğu gözlenirken, Flk-1 immunoreaktivitesinin negatif (-) olduğu, Flt-1 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette (+) olduğu izlendi. İ/R+res grubunda VEGF immunoreaktivitesinin orta şiddette (++) , Flk-1 immunoreaktivitesinin çok zayıf şiddette (+/-), Flt-1 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette (+) olduğu gözlemlendi. İ/R+res grubunda VEGF, Flk-1 ve Flt-1 immunoreaktivitelerinin sham grubu ile benzer olduğu görüldü. İ/R+res grubu İ/R uygulanan grupla karşılaştırıldığında ise VEGF ve Flt-1 immunoreaktivitelerinin İ/R+res grubunda daha az olduğu saptandı. İ/R grubunda Flk-1 immunoreaktivitesi negatifken İ/R+res grubunda çok zayıf olduğu görüldü ve resveratrol uygulamasının sonrasında İ/R ile birlikte Flk-1'in tetiklendiği düşünüldü. Her üç grupta da VEGF, Flk-1, Flt-1 immunoreaktivitelerinin hem epidermis, hem bağ dokusunda ve endotel hücrelerinde pozitif olduğu izlendi. Tablo 11'de tüm grupların karşılaştırmalı sonuçları gösterilmiştir. Gruplara ait VEGF, Flk-1, Flt-1 immunoreaktivitelerinin dağılımı resim 10'da sunulmuştur.

Tablo 11: Tüm gruplara ait örneklerde VEGF, Flk-1, Flt-1 dağılımlarının immunohistokimyasal olarak karşılaştırılmalı sonuçları

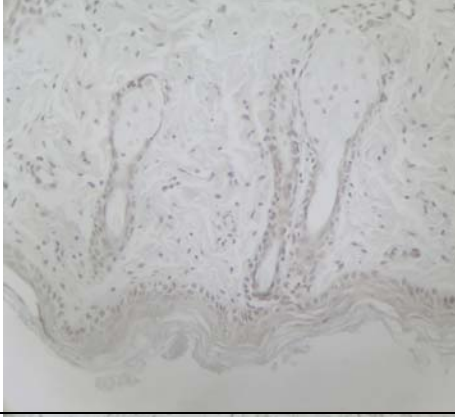
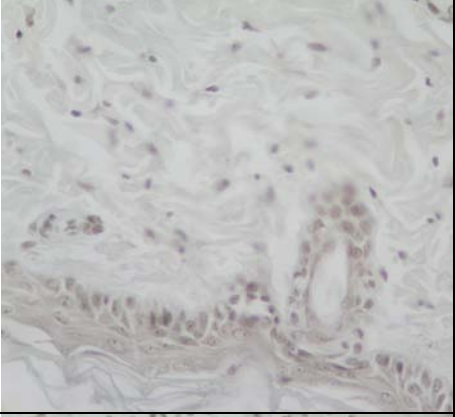

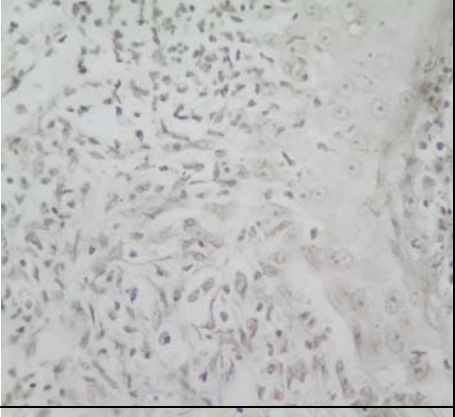
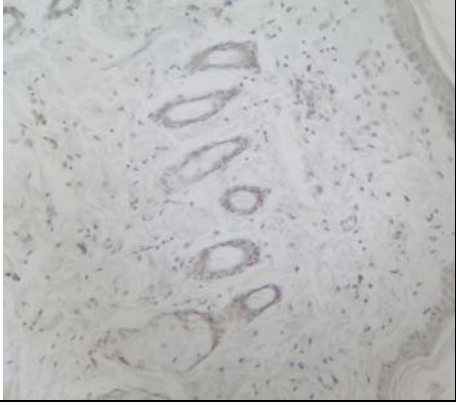
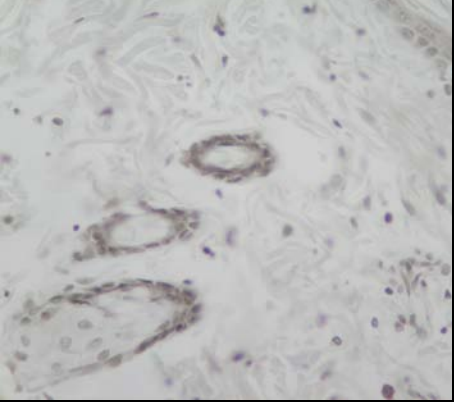
	Sham	İ/R	İ/R+res
VEGF	++	++ yer yer +++	++
Flk-1	+/-	-	+/-
Flt-1	+	+	+

	VEGF	Flk-1	Flt-1
Sham			
i/R			
i/R+res			
Kontrol IHC			

Resim 10: Gruplardaki VEGF, Flk-1 ve Flt-1 immunoreaktiviteleri dağılımı.
X200

4.2.3. TUNEL Boyaması

TUNEL boyaması sonucunda ise 1. haftada alınan örneklerde her üç grupta da epidermis, dermis ve ayrıca eklerinde apoptotik hücreler %1 oranında gözlendi. Gruplar arasında farklılık olmadığı saptandı. Bu TUNEL boyaması sonucunda görülen pozitif hücrelerin ise normal hücre sirkülasyonu sonucunda görülen apoptotik hücreler olduğu düşünüldü. Gruplara ait TUNEL boyaması örnekleri resim 11'de sunulmuştur.

	X200	X400
Sham		
i/R		
i/R+res		

Resim 11: Gruplara ait TUNEL boyaması örnekleri. X200, X400.

5. TARTIŞMA

Flepler yüzyıllar önce tanımlanmalarına rağmen halen, flep temel fizyolojisine ait çözüm bekleyen birçok soru bulunmaktadır(145). Anatomi, fizyoloji, cerrahi teknik alanında yapılan çalışmalarla artan bilgi birikimine karşılık flep nekrozu önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Flep nekrozu hasta morbiditesine yol açmakta, bu da ek ameliyatlara, hastanede kalış süresinin uzamasına, artan maliyete ve hasta psikolojisinin olumsuz etkilenmesine sebep olmaktadır(30,146). Bu nedenle flep nekroz nedenlerini bulmaya ve nekrozu önlemeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır.

Niçin bazı fleplerin tamamı yaşarken bazı fleplerde kayıplar görülmektedir? Bu soru cevaplanması zor bir sorudur. En azından yanıtın multifaktöriyel olduğu söylenebilir. Tabi ki doğru flep planlaması ve düzgün cerrahi teknik flep yaşayabilirliğini belirlemede kritik faktörlerdir(11). Flep nekroz nedenleri ekstrensek ve intrensek olarak ikiye ayrılabilir. Temel intrensek neden flebin yeterli kan akımına sahip olmamasıdır. Ekstrensek nedenler sistemik ve lokal nedenler olarak ikiye ayrılır. Sistemik nedenler hipotansiyon, enfeksiyon, vazokonstriktör ajan kullanımı gibi nedenlerdir. Lokal nedenler bası, gerginlik, hematoma olarak sayılabilir(147).

Flep elevasyonu ile birlikte hassas bir şekilde ayarlanmış olan doku kan akımı dengesi bozulur. Flep proksimal bölümünde sempatektomi ve kateşolamin deşarjına bağlı akım azalırken, distal bölümünde ise lokal iskemi vazodilatasyona yol açar. Bu da perfüzyon basıncını düşürerek yeterli kan akımının distale ulaşmasını engeller. Bu durum flep fizyolojisinin bir parçasıdır. Doğru planlanan bir flepte akım dereceli olarak artacak ve flepte nekroz gelişmeyecektir. Ancak flep yanlış planlanmışsa; hipotansiyon, pedikülde katlanma, bası gibi lokal yada sistemik dolaşımı kötü etkileyen nedenler söz konusu ise iskemi devam edecektir(11). Serbest fleplerde flebin bir bölgeden diğerine transferi esnasında kaçınılmaz bir şekilde iskemi ile karşılaşılır ve bu durum primer iskemi olarak adlandırılır. Anastomoz gerçekleştirildikten sonra dolaşımda meydana gelebilecek herhangi bir problemin yaratacağı iskemi ise sekonder iskemidir. Sekonder iskemi genellikle kötü teknikten kaynaklanır. İskeminin kaçınılmaz olduğu diğer bir

durum ise replantasyondur. Replante edilecek parça değişen sürelerde iskemiye maruz kalmaktadır(3).

Yani flep cerrahisinde iskemi ile karşılaşmak kaçınılmazdır. İskeminin çözümü dokuya yeniden kan akımının sağlanması, yani reperfüzyondur. Ancak kritik sürelerin aşılması sonucunda dokuya gelen kan akımı yeni bir patolojik süreci başlatacaktır. Bu durum İ/R hasarıdır(4,8,9).

Flep kayıplarının önemli bir nedeni olması sebebi ile İ/R hasarını anlamaya ve önlemeye yönelik pek çok çalışma yapılmıştır. İ/R hasarında pek çok farklı maddenin rol oynadığı saptanmıştır. Serbest radikaller, nötrofiller, mast hücreleri, araşidonik asit metabolitleri, NO, sitokinler ve apoptozis bu süreçte kilit rol oynamaktadır. Bu nedenle İ/R hasarını önlemeye yönelik yapılan çalışmalarda bu maddeler ve apoptozis süreci hedef alınmış ve pek çok ajan kullanılmıştır(11). Serbest radikallere karşı antioksidanlar (süperoksit dismutaz(73,148), allopürinol(73,149), deferoksamin(150), vitamin C(151)), nötrofillere karşı immunsüpresif ajanlar (siklosporin, FK506(152), nötrofil yuvarlanma ve adezyon reseptör antikorları(71,153), mast hücrelerine karşı antihistaminikler(88), araşidonik asit metabolizmasını düzenlemeye yönelik ajanlar (iloprost(83), tromboksan sentetaz inhibitörleri(84)), NO prekürsör ve donörleri (78,79,154), apoptozis inhibisyonu için kaspaz inhibitörü (155) bu ajanlara örnektir.

İ/R hasarı ile yalnız flep cerrahisinde karşılaşılmaz. Hipovolemik şok, inme, miyokard infarktüsü, organ nakli İ/R hasarının görüldüğü bu farklı alanlara örnektir(3,11). Bu alanlarda da İ/R hasarını önlemek için çalışmalar yapılmıştır. Bu amaçla kullanılan ajanlardan biri güçlü bir antioksidan olan resveratroidür(20-23). Resveratrol yalnızca antioksidan değil, aynı zamanda antiinflamatuvar(16,11-115), antiagregan(12,118) ve vazorelaksan(15,119) özelliklere sahiptir. Yani İ/R hasarında yer alan pek çok basamağa etkilidir. Muhtemelen güçlü etkinliğini de farklı basamaklara etki edebilme yeteneğinden almaktadır.

Biz bu çalışmada cilt fleplerinde İ/R hasarında resveratrolün etkinliğini araştırmayı amaçladık. Yapılan literatür çalışmasında cilt fleplerinde İ/R

hasarının önlenmesinde resveratrolün etkinliğini inceleyen herhangi bir çalışmaya rastlamadık.

Bu amaçla sıçanda inferior epigastrik flep modelini kullandık. Bu flep modelini kullanmamızın nedeni iyi tanımlanmış, sabit anatomik yapısının olması, diseksiyonunun kolay olması ve tekrarlanabilir bir model olmasıdır(145).

Deney modelimizde iskemi süresini 8 saat olarak belirledik. Çünkü cilt fleplerinde kritik iskemi süresinin 6-12 saat olduğu saptanmıştır. Bu kritik süre aşıldıktan sonra ortama oksijen gelmesi iskemik hasara reperfüzyon hasarının eklenmesine neden olmaktadır(11). Cilt fleplerinde İ/R hasarının araştırıldığı farklı çalışmalarda da iskemi süresi 8 ila 12 saat arasında değişmektedir(31,156-158).

Çalışmamızda 5 mg/kg dozda resveratrolü, iskemiden 15 dakika önce ve reperfüzyondan hemen önce olmak üzere 2 doz şeklinde, intraperitoneal uyguladık. Farklı deneysel çalışmalarda resveratrolün dozu, uygulama zamanlaması ve uygulama yolu değişmektedir.

Literatürde resveratrol dozu 10^{-6} mg/kg ile 20 mg/kg arasında değişmektedir. Huang ve arkadaşlarının serebral iskemide resveratrolün etkinliğini araştırdıkları çalışmada resveratrolü 10^{-6} ile 10^{-3} mg/kg aralığında değişen farklı dozlarda uygulamışlar ve en etkili dozun o çalışmada kullanılan en yüksek dozlar olan 10^{-4} ve 10^{-3} mg/kg olduğunu saptamışlardır(159). Hassan-Khabbar ve arkadaşlarının'nın yaptığı bir çalışmada karaciğer İ/R hasarında resveratrol 0.02, 0.2, 2 ve 20 mg/kg olmak üzere 4 farklı dozda uygulanmıştır. Düşük dozda resveratrol uygulamasının sitoprotektif olduğu saptanırken, 20 mg/kg dozda resveratrol uygulamasının karaciğerdeki hasarı arttırdığı ve yüksek dozda resveratrolün bir prooksidan madde gibi davrandığı saptanmıştır(139). Gedik ve arkadaşlarının'nın yaptığı diğer bir karaciğer İ/R hasarı çalışmasında resveratrol 10 mg/kg dozda uygulanmış ve bu dozda resveratrolün sitoprotektif etki gösterdiği saptanmıştır(21). Pek çok İ/R çalışmasında etkin resveratrol dozunun 5 ila 10 mg/kg arasında değiştiği görülmektedir(21,22,160). Biz bu nedenle çalışmamızda, farklı dokularda

etkinliğini kanıtlamış doz aralığında bulunan ve prooksidan olmayan 10 mg/kg dozda resveratrol kullandık.

Bu resveratrol dozunu ikiye bölerek yarısını iskemiden 15 dakika önce, yarısını da reperfüzyon öncesinde uyguladık. Resveratrol farklı çalışmalarda farklı zamanlarda uygulanmıştır. Yalnız iskemiden önce(160-161), yalnız reperfüzyondan önce(21,22,139) ve hem iskemi hem de reperfüzyondan önce(20) uygulandığı çalışmalar mevcuttur. Bu çalışmalarda uygulamalar, resveratrol hızla metabolize olduğu için iskemi ya da reperfüzyonun hemen öncesinde ya da en erken 30 dakika öncesinde yapılmıştır. Biz bu çalışmada resveratrolü hem iskemi hem de reperfüzyon öncesinde uyguladık. Bunun sebebi resveratrolün antioksidan özelliğinin yanısıra varolan antiniflamatuar, antiagregan ve vazorelaksan özelliklerinden iskemi döneminde gelişebilecek hasara karşı faydalanmak istememizdir.

Literatürde İ/R çalışmalarında resveratrol intraperitoneal(22,23) ve intravenöz yolla(20,21,139,160) uygulanmıştır. Resveratrolün oral alımını takiben metabolizmasının ve eliminasyonunun hızlı olması nedeniyle biyoyararlanımı düşüktür(162,163). Bu nedenle oral uygulama tercih edilmez. Biz bu çalışmada uygulama kolaylığı nedeni ile intraperitoneal yolu tercih ettik.

Bu çalışmada resveratrolün, cilt fleplerinde görülen İ/R hasarını önlemede etkili olup olmadığı yaşayan flep oranı ile belirlenmiştir. Ortalama yaşayan flep oranları sham grubunda % 100±0,00 , İ/R grubunda % 24,65±6,28 ve İ/R+res grubunda % 99,25±1,96 saptanmıştır. Bu sonuçlar değerlendirildiğinde resveratrolün cilt fleplerinde görülen İ/R hasarını önlemede son derece etkili olduğu söylenebilir. Bu sonuç istatistiksel olarak da anlamlı bulunmuştur (p< 0,01).

Bu çalışmada resveratrolün etki mekanizmasını ortaya koymak adına bazı histolojik incelemeler yapılmıştır. Doku morfolojisini saptamak ve resveratrolün nötrofiller üzerine etkisi olup olmadığını araştırmak için erken ve geç dönemde hematoksilen-eozin boyama yapılmıştır. Resveratrolün inflamatuar sitokinler üzerine olan etkisini araştırmak amacı ile erken dönemde histolojik incelemelerde TNF-α ve IL-1β dağılımları araştırılmıştır.

Resveratrolün angiogenesis üzerine etkisini araştırmak için geç dönemde VEGF, Flk-1 ve Flt-1 dağılımları bakılmıştır. Ayrıca cilt fleplerinde İ/R hasarında hücre ölümünde etkin mekanizmanın apoptozis mi yoksa nekroz mu olduğunu saptamak için geç dönemde TUNEL boyaması kullanılmış ve apoptotik hücrelerin oranı hesaplanmıştır.

Nötrofillerin İ/R hasarında lokal inflamatuvar yanıtın önemli bir parçası olduğu ve serbest radikal ürettikleri gösterilmiştir(11,30,164,165). Nötrofil sayısını azaltan ya da nötrofil fonksiyonunu önleyen çalışmalarda İ/R hasarının önemli ölçüde azaldığı saptanmıştır(10,70,71,165). Bu nedenle çalışmamızda resveratrolün İ/R hasarında kilit rol oynayan nötrofiller üzerine etkisi olup olmadığı araştırılmıştır. Erken dönemde grupların tamamında nötrofil infiltrasyonu saptanmamıştır. Geç dönemde ise sham ve İ/R+res grubunda nötrofil infiltrasyonu görülmezken İ/R grubunda yoğun nötrofil infiltrasyonu saptanmıştır. Bu durum resveratrolün nötrofil istilasını önlediğini göstermektedir. Resveratrolün muhtemel etki mekanizmalarından biri bu nötrofil göçünü önlemesi olabilir.

Cilt fleplerinde görülen İ/R hasarında inflamatuvar sitokinlerden TNF- ve IL-1β'nin arttığı gösterilmiştir(166). Resveratrolün farklı dokularda gelişen inflamatuvar olaylarda bu sitokinleri baskıladığı saptanmıştır. Marier ve arkadaşlarının yaptıkları in vitro bir çalışmada lipopolisakkarid ile indüklenen inflamatuvar sitokin üretiminin doz bağımlı olarak resveratrol ile baskılandığı gösterilmiştir(114). Bujanda ve arkadaşları alkolün neden olduğu karaciğer hasarında IL-1 düzeylerinin arttığını ve resveratrol tedavisi ile bu sitokinin anlamlı olarak azaldığını saptamışlardır(167).

Resveratrolün cilt fleplerinde gelişen İ/R hasarında inflamatuvar sitokinler üzerine etkisini saptamak amacı ile TNF- ve IL-1β dağılımları histolojik kesitlerde araştırılmıştır. Sham grubunda hem TNF- hem de IL-1β immunoreaktiviteleri negatif bulunurken, İ/R grubunda TNF-'nın çok zayıf, yer yer de zayıf şiddette olduğu saptandı. Aynı grupta IL-1β immunoreaktivitesinin ise çok zayıf şiddette olduğu görüldü. İ/R+res grubunda TNF-'nın zayıf şiddette olduğu görülür iken, IL-1β'nin çok zayıf, yer yer ise zayıf şiddette olduğu görüldü.

Resveratrol ile yapılan farklı çalışmalarda resveratrolün TNF- α ve IL-1 β 'yi baskıladığı gösterilmişse de bizim çalışmamızda bu etki saptanmamıştır. Resveratrolün TNF- α ve IL-1 β 'yi doz bağımlı olarak baskıladığı yapılan in vitro çalışmada gösterilmiştir. Bu çalışmada TNF- α 'nın tam baskılanması resveratrolün 10 μ M konsantrasyonunda gerçekleşirken, IL-1 β 'nin tam baskılanması 0.1 μ M konsantrasyonda gerçekleşmiştir(114). Çalışmamızda dokuya ulaşan resveratrol dozu bilinmemektedir. Dokuda resveratrolün ulaştığı doz sitokinleri baskılamak için yetersiz kalmış olabilir. Bu nedenle resveratrolün dokuda ulaştığı dozu saptayarak farklı resveratrol dozlarında sitokinler üzerine etki araştırılabilir.

Ancak bu sonuç çalışmamızda resveratrolün antiinflamatuvar etki göstermediği anlamını taşımamaktadır. Çünkü resveratrol pek çok farklı mekanizma üzerinden antiinflamatuvar etki göstermektedir. Siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzimlerini inhibe etmesi(111-113), endotelial adezyon moleküllerinin ekspresyonunu azaltması(115) NF κ B (nükleer faktör kappa B) inhibisyonu yapması(117) bu mekanizmalara örnektir. Bu nedenle cilt fleplerinde İ/R hasarında resveratrolün antiinflamatuvar etkinliğinin bu mekanizmalar ve diğer mediatörler (Lökotrienler, prostoglandinler, IFN- γ , IL-8, PAF) üzerinden de araştırılması gerekir.

Flep cerrahisinde anjiogenez istenen, flep yaşayabilirliğini arttıran bir faktördür. Nitekim, VEGF uygulamasının flep yaşayabilirliğini arttırdığını saptayan yayınlar mevcuttur(168,169).

Biz de çalışmamızda resveratrolün anjiogenez üzerine olan etkisini araştırmak amacı ile postoperatif 7. günde alınan örneklerde VEGF, Flk-1 ve Flt-1 immunoreaktivitelerini inceledik. Alınan örneklerde sham grubunda VEGF immunoreaktivitesinin orta şiddette, Flk-1 immunoreaktivitesinin çok zayıf şiddette, Flt-1 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette olduğu gözlemlendi. İ/R grubunda ise VEGF immunoreaktivitesinin orta şiddette, yer yer ise kuvvetli olduğu gözlenirken, Flk-1 immunoreaktivitesinin negatif olduğu, Flt-1 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette olduğu izlendi. İ/R+res grubunda VEGF immunoreaktivitesinin orta şiddette, Flk-1 immunoreaktivitesinin çok zayıf şiddette, Flt-1 immunoreaktivitesinin ise zayıf şiddette olduğu gözlemlendi.

Sonuçlar değerlendirildiğinde İ/R grubunda sham grubuna göre VEGF ve Flt-1 immunoreaktivitesinin artmış olduğu görüldü. Yapılan çalışmalarda serbest radikallerin VEGF ekspresyonunu ve salınımını arttırdığı gösterilmiştir(170-171). İ/R grubunda görülen VEGF ve Flt-1 immunoreaktivitesindeki bu artış serbest radikallerin uyarıcı etkisine bağlı olabilir. İ/R+res grubunda ise İ/R grubuna göre yalnız Flk-1 aktivitesinin artmış olduğu görüldü. Resveratrolün antioksidan etkisi nedeni ile serbest radikalleri ortadan kaldırması VEGF üzerine olan önemli bir uyarıcı etkiyi de ortadan kaldırmış olabilir. Ayrıca resveratrolün VEGF üzerine etkisi doz bağımlıdır. İn vitro 1, 5, 10 µM dozlarda resveratrol VEGF üzerine uyarıcıdır(122). Bu çalışmada resveratrolün dokuda VEGF için uyarıcı olan doz aralığına ulaşip ulaşmadığı bilinmemektedir. Dokuda etkin doza ulaşmayı sağlayan sistemik doz aralığı belirlenerek bu dozda verilen resveratrolün VEGF ve reseptörleri üzerine olan etkisi araştırılabilir.

İ/R hasarında hücre ölümünde nekrozun mu yoksa apoptozisin mi etkin olduğu halen tartışmalıdır. Biz bu çalışmada cilt fleplerinde gelişen İ/R hasarında hücre ölümünde apoptozisin rolünü araştırmak ve eğer hücre ölümünde baskın mekanizma apoptozis ise resveratrolün apoptozis üzerine etkisini saptamak amacı ile apoptotik hücre oranını hesapladık. Apoptotik hücreleri tespit etmek için postoperatif 7. günde alınan örneklerde TUNEL boyamasını kullandık. TUNEL boyamasında apoptotik hücreleri belirlerken nekrotik hücreleri ayırt etmek için hücre morfolojisini de dikkate aldık. Her üç grupta da epidermis, dermis ve ayrıca eklerinde apoptotik hücreler %1 oranında gözlemlendi. Gruplar arasında farklılık olmadığı saptandı. Bu TUNEL boyaması sonucunda görülen pozitif hücrelerin ise normal hücre sirkülasyonu sonucunda görülen apoptotik hücreler olduğu düşünüldü.

Yani bizim çalışmamızda hücre ölümünde temel etkin mekanizmanın nekroz olduğu saptandı. Literatürde İ/R hasarında hücre ölümünde etkin mekanizmaların araştırıldığı çalışmalarda farklı sonuçlar söz konusudur. Pek çok farklı dokuda yapılan çalışmaların sonucu apoptozisin İ/R hasarında etkin rol oynadığı yönündedir(93,96,97-100). Ancak Gujral ve arkadaşlarının yaptığı çalışma bu çalışmalara ciddi eleştiriler getirmiştir. Bu çalışmalarda

apoptotik hücre varlığını saptamak için kullanılan TUNEL yönteminin apoptozise spesifik olmadığı nekrotik hücrelerin de TUNEL ile boyandığı gösterilmiştir. Bu nedenle apoptotik hücre oranını saptarken mutlak hücre morfolojisininin de dikkate alınması gerektiği söylenmiştir. Ayrıca pankaspaz inhibitörlerinin ve bcl-2'nin nekroz mekanizmalarını da inhibe ettiği söylenerek bu çalışmalarda alınan olumlu sonuçların yalnız apoptozisin önlenmesine bağlanmaması gerektiği bildirilmiştir(101,102).

Resveratrolün apoptozis üzerine etkisini araştıran çalışmalarda hücre tipi ve doz bağımlı olarak resveratrolün bifazik etkiye sahip olduğu saptanmıştır(125,126). Bizim çalışmada hücre ölümünde apoptozisin etkin mekanizma olmadığı saptanmıştır. Bu nedenle resveratrolün apoptozis üzerine etkisi de araştırılmamıştır.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada cilt fleplerinde gelişen İ/R hasarına karşı resveratrolün etkinliği araştırılmıştır.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular aşağıda sıralanmıştır:

1) Sıçan inferior epigastrik arter flebinde uygulanan İ/R modelinde resveratrolün yaşayan flep oranlarını istatistiksel olarak anlamlı bir biçimde arttırdığı gösterilmiştir.

2) Postoperatif 7. günde alınan örneklerde resveratrolün nötrofil istilasını baskıladığı saptanmıştır.

3) Resveratrolün inflamatuvar sitokinlerden TNF- α ve IL-1 β 'yi baskılayamadığı görülmüştür.

4) Resveratrol anjiogenezin temel uyarıcı maddesi olan VEGF ve VEGF'ün reseptörlerinden Flt-1 üzerine etkili olmadığı, yalnız Flk-1'i uyardığı saptanmıştır.

5) Cilt fleplerinde İ/R hasarında temel ölüm mekanizmasının nekroz olduğu, apoptozis olmadığı görülmüştür.

Bu sonuçlar doğrultusunda resveratrolün cilt fleplerinde İ/R hasarını önlemede yaşayan flep oranını belirgin olarak artırması nedeni ile son derece etkili olduğunu söyleyebiliriz. Ancak resveratrolün etkin doz aralığını bulmak adına madde farklı dozlarda denenmeli ve doz bağımlı etkileri olan antiinflamatuvar ve anjiogenetik etki tekrar araştırılmalıdır. Ayrıca amputasyon gibi durumlarda iskemi öncesi ilacın tatbiki mümkün olmadığı için yalnız reperfüzyon öncesi resveratrol uygulanması durumunda etkinlik araştırılmalıdır. Bundan sonraki amaç insanda güvenli ve etkin doz aralığının saptanması ve maddenin klinik uygulamaya girmesidir. Resveratrol oldukça güçlü bir antioksidan madde olması ve yapılan deneysel çalışmalarda bu etkinliğini kanıtlamış olması nedeni ile klinik uygulama açısından son derece ümit vericidir.

7. ÖZET

Flepler yüzyıllar önce tanımlanmalarına rağmen halen, flep temel fizyolojisine ait cevap bekleyen birçok soru bulunmaktadır. Anatomi, fizyoloji, cerrahi teknik alanında yapılan çalışmalarla artan bilgi birikimine karşılık flep nekrozu önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Flep kayıplarının önemli bir nedeni de İ/R hasarıdır.

Resveratrol üzüm tanelerinde bol miktarda bulunan polifenol yapıda doğal bir antioksidandır. Deneysel çalışmalarda resveratrolün karaciğer, beyin gibi farklı dokularda gelişen İ/R hasarını önlemede etkin olduğu gösterilmiştir.

Resveratrolün farklı dokulardaki İ/R hasarını önlemede etkin olması bu antioksidanın cilt fleplerinde görülen İ/R hasarında etkili olup olamayacağı sorusunu aklımıza getirmiştir.

Bu amaçla yapılan deneysel çalışmada 21 adet sıçan kullanılmıştır. Sıçanlar 3 gruba ayrılmıştır. Sham grubunda inferior epigastrik arter flebi kaldırılmış, İ/R uygulanmamıştır. İ/R grubunda flebe 8 saat iskemi ve ardından reperfüzyon uygulanmıştır. İ/R+res grubunda ise flebe iskemi uygulanmadan 15 dakika önce ve reperfüzyondan hemen önce olacak şekilde 5 mg/kg resveratrol uygulanmıştır. Tüm gruplardan reperfüzyon sonrası 24. saatte ve postoperatif 7. günde histolojik inceleme için örnekler alınmıştır. Alınan erken ve geç dönem örnekleri doku morfolojisini belirlemek için hematoksil-eozin ile boyanmıştır. Erken dönem kesitlerinde IL-1 β ve TNF- α dağılımları, geç dönem kesitlerinde ise VEGF, Flk-1 ve Flt-1 dağılımları ve apoptotik hücre oranı incelenmiştir. Tüm flepler postoperatif 7. günde fotoğraflanmış ve yaşayan flep oranı hesaplanmıştır.

Resveratrolün yaşayan flep oranını anlamlı biçimde arttırdığı saptanmıştır. Nötrofil istilasını önlediği görülmüştür. Buna karşılık resveratrolün inflamatuvar sitokinler üzerine baskılayıcı etki göstermediği, VEGF, Flt-1 üzerine uyarıcı olmadığı, yalnız Flk-1' i minimal uyardığı gösterilmiştir. Ayrıca cilt fleplerinde İ/R hasarında apoptozisin etkin rol oynamadığı saptanmıştır.

Bu sonuçlar doğrultusunda resveratrolün cilt fleplerinde İ/R hasarını önlemede etkin olduğu ve klinik uygulama için ümit verici olduğu düşünülmüştür.

8. İNGİLİZCE ÖZET

Evaluating the efficiency of resveratrol on ischemia reperfusion injury in skin flaps

Although flaps have been described centuries ago, there are many questions waiting for answers about basic physiology of the flaps. Though increase of the knowledge with studies about anatomy, physiology and surgical technical areas, flap necrosis is still an important problem. One of the important cause of flap loss is I/R injury.

Resveratrol which is found ample in grapes is a polyphenol and a natural antioxidant. In experimental studies resveratrol was found that it was effective on preventing I/R injury in several tissues like liver and brain.

Efficiency of resveratrol on preventing I/R injury in several tissues directed us to research whether this antioxidant has an effect on I/R injury in skin flaps or not.

In experimental study with this purpose 21 rats were used. Rats were divided into 3 groups. In sham group inferior epigastric artery flaps were elevated and I/R wasn't applied. In I/R group ischemia was applied for 8 hours followed by reperfusion. In I/R+res group 5mg/kg resveratrol was administered 15 minutes before ischemia and just before the onset of reperfusion. After 24 hours from reperfusion and 7th postoperative day specimens were taken from all groups for histological examination. Early and late periods specimens were stained with haematoxylin and eosin to identify tissue morphology. Distributions of IL-1 β and TNF- α were investigated in early specimens. Distributions of VEGF, Flk-1, Flt-1 and rate of apoptotic cells were investigated in late specimens. All flaps were photographed on 7th postoperative day and rates of surviving flaps were calculated.

It was found that resveratrol increased rates of surviving flaps significantly. On the other hand resveratrol wasn't effective on suppressing inflammatory cytokines and on inducing VEGF, Flt-1, it only induced Flk-1 minimally. Also, it was found that apoptosis didn't play an effective role on I/R injury in skin flaps.

As a result of this study we think that resveratrol is effective on preventing I/R injury in skin flaps and it is promising for clinical usage.

9. KAYNAKLAR

1. Place MJ, Herber SC, Hardesty RA. Basic techniques and principles in plastic surgery. In: Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM, eds. Grabb and Smith's Plastic Surgery, 5th ed. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, 1997: 13-25.
2. Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, et al. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol.* 1968 Feb;52(2):437-53.
3. van den Heuvel MG, Buursman WA, Bast A, et al. Review: Ischemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg.* 2009 Jun;62(6):721-6.
4. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery.* 1994; 81: 637-647.
5. Lin E, Lowry SF, Calvano SE. The systemic response to injury. In: Schwartz SI, editor. *Principles of Surgery*, 7 th ed. Mc Graw-Hill, 1999: Vol I, 13-32.
6. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 2000;86: 117-118.
7. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000; 39:1529-1542.
8. Kuzu MA, Köksoy C, Kale İT, et al, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
9. Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. *Surgical Clinics of North America* 1992; 72: 65-83.
10. Cetin C, Kose AA, Aral E, et al. Protective effect of fucoidin(a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury:experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg* 2001;47:540-6.
11. Vedder NB. Flap physiology. In: Mathes SJ, editor. *Plastic Surgery*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc, 2006: Vol1, 483-506.

12. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Wine as a biological fluid: history, production, and role in disease prevention. *J Clin Lab Anal* 1997; 11: 287-313.
13. Bertelli A, Bertelli AA, Gozzini A, et al. Plasma and tissue resveratrol concentrations and pharmacological activity. *Drugs Exp Clin Res* 1998; 24(3):133-8.
14. Lin JK, Tsai SH. Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol. *Proc Natl Sci Counc Repub China B*. 1999 Jul;23(3):99-106.
15. Leikert JF, Rathel TR, Wohlfart P, et al. Red wine polyphenols enhance endothelial nitric oxide synthase expression and subsequent nitric oxide release from endothelial cells. *Circulation* 2002 Sep 24;106(13):1614-7.
16. Pellegatta F, Bertelli AA, Staels B, et al. Different short- and long-term effects of resveratrol on nuclear factor-kappaB phosphorylation and nuclear appearance in human endothelial cells. *Am J Clin Nutr* 2003 May;77(5):1220-8.
17. Frémont L. Biological effects of resveratrol. *Life Sci*. 2000 Jan 14;66(8):663-73.
18. Burkitt MJ, Duncan J. Effects of trans-resveratrol on copper-dependent hydroxyl-radical formation and DNA damage: evidence for hydroxyl-radical scavenging and a novel, glutathione-sparing mechanism of action. *Arch Biochem Biophys*. 2000 Sep 15;381(2):253-63.
19. Yen GC, Duh PD, Lin CW. Effects of resveratrol and 4-hexylresorcinol on hydrogen peroxide-induced oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Free Radic Res*. 2003 May;37(5):509-14.
20. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, et al. Resveratrol exerts its neuroprotective effect by modulating mitochondrial dysfunctions and associated cell death during cerebral ischemia. *Brain Res*. 2009 Jan 23;1250:242-53
21. Gedik E, Girgin S, Ozturk H, et al. Resveratrol attenuates oxidative stress and histological alterations induced by liver ischemia/reperfusion in rats. *World J Gastroenterol*. 2008 Dec 14;14(46):7101-6.

22. Elmali N, Esenkaya I, Karadağ N, et al. Effects of resveratrol on skeletal muscle in ischemia-reperfusion injury. *Ulus Travma Acil Cerrahi Derg.* 2007 Oct;13(4):274-80.
23. Ozkan OV, Yuzbasioglu MF, Ciralik H, et al. Resveratrol, a natural antioxidant, attenuates intestinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Tohoku J Exp Med.* 2009 Jul;218(3):251-8.
24. Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flap surgery. In: Mc Carthy JG, ed. *Plastic Surgery.* Philadelphia: WB Saunders, 1990:275-328.
25. Palmer B, Jurel G, Norberg KA. The blood flow in experimental skin flaps in rats studied by means of the 133 xenon clearance method. *Scand J Plast Reconstr Surg* 1972;6:6-12.
26. Nathanson SE, Jackson RT. Blood flow measurements in skin flaps. *Arch Otolaryngol* 1975;101:354-357.
27. Kerrigan CL, Daniel RK. Monitoring acute skin-flap failure. *Plast Reconstr Surg* 1983;71:519-524.
28. Kerrigan CL, Daniel RK. Skin flap research: a candid view. *Ann Plast Surg* 1984;13:383-387.
29. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, et al. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg* 1994;93:1485-1495, discussion 1496-1497.
30. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery* 1993;14(3):165-75.
31. Yoshida WB, Campos EB. Ischemia and reperfusion in skin flaps: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. *Acta Cir Bras* 2005;20:358-63.
32. Mitchell RN, Cotran RS. Hücre zedelenmesi, ölümü ve adaptasyonu. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editörler; *Temel Patoloji.* Altıncı edisyon. (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 3-24.

33. Suval WD, Duran WN, Boric MP, et al. Microvascular transport and endothelial cell alterations precede skeletal muscle damage in ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg* 1987; 154:211-218.
34. Morin D, Hauet T, Spedding M, et al. Mitochondria as target for antiischemic drugs. *Adv Drug Deliv Rev* 2001 Jul 2;49(1-2):151-74.
35. Mathes SJ, Nahai F: *Reconstructive Surgery : Principles, Anatomy and Technique* . London: Churchill Livingstone, 1997.
36. Cryer HG. Therapeutic approaches for clinical ischemia and reperfusion injury. *Shock* 1997 Jul;8(1): 26-32.
37. Kristian T, Siesjö BK. Calcium-related damage in ischemia. *Life Sci* 1996;59(5-6):357-67.
38. Kılınç K. , Kılınç A. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33: 110-118.
39. Halliwell B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? *Lancet* 1994 Sep 10;344(8924):721-4.
40. Gavrieli Y, Sherman Y, Shmuel A, et al. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *The Journal of Cell Biology* 1992; 119 (3): 493-501.
41. Dawn BM, Allan DM, Colleen MS. *Basic Medical Biochemistry a Clinical Approach*. Baltimore, Maryland: Lippincott Williams & Wilkins, 1996.
42. Akkuş İ. *Serbest radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri*. Konya: Mimoza yayınları, 1995.
43. Burtis CA, Ashwood ER. *Tietz Textbook of Clinical Chemistry*. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company, 1999.
44. Beyer RE. An analysis of the role of coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell Biol* 1992 Jun;70(6):390-403.
45. Bast A, Haenen GR, Doelman CJ. Oxidants and antioxidants: state of the art. *Am J Med* 1991 Sep 30;91(3C):2S-13S.
46. Robinson BS, Hii CS, Ferrante A. Activation of phospholipase A2 in human neutrophils by polyunsaturated fatty acids and its role in

stimulation of superoxide production. *Biochem J.* 1998 Dec 15;336 (Pt 3):611-7.

47. Parks DA, Granger DN. Xanthine oxidase: biochemistry, distribution and physiology. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986;548:87-99.
48. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW. Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand Suppl* 1986; 548: 39-46.
49. Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia. *Am J Physiol* 1986 Oct; 251(4 Pt 1):G567-74.
50. Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim* 1995; 8: 3906-3911.
51. Uysal M. Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11: 336-341.
52. Uchida K. Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. *Free Radic Res* 2000 Dec; 33(6):731-7.
53. Cutler RG, Mattson MP. Measuring oxidative stress and interpreting its clinical relevance for humans. In: Cutler RG, Rodriguez H, eds. *Critical reviews of oxidative stress and aging: Advances in basic science, diagnostics and intervention.* Singapore: World Scientific Publishing, 2003: 137.
54. Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, et al. Vitamin C reduces ischemia reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. *Ann Plast Surg* 1994 Dec; 33(6): 620-3.
55. Lenton KJ, Therriault H, Fülöp T, et al. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis*, 1999 Apr; 20(4): 607-13.
56. Kolanjiappan K, Ramachandran CR, Manoharan S. Biochemical changes in tumor tissues of oral cancer patients. *Clin Biochem* 2003 Feb, 36(1):61-5.

57. Perez HD, Weksler BB, Goldstein IM. Generation of a chemotactic lipid from a arachidonic acid by exposure to a superoxide-generating system. *Inflammation*. 1980 Sep;4(3):313-28.
58. Mitchell RN, Cotran RS. Akut ve kronik inflamasyon. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editörler; *Temel Patoloji*. Altıncı edisyon. (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 25-46.
59. Vedder NB, Harlan JM. Neutrophil-endothelial interactions. In: Shoemaker WC, Ayres SM, Grenvik A, Holbrook PR, eds. *Textbook of Critical Care*, 4th ed. Philadelphia, WB Saunders, 1999:570-577.
60. Grant L. The sticking and emigration of white blood cells in inflammation. In: Zweifach BW, Grant L, McCluskey L, eds. *The Inflammatory Process*, vol 2. Orlando, Academic Press, 1973:205-249.
61. Harlan JM, Winn RK, Vedder NB, et al. In vivo models of leukocyte adherence to endothelium. In: Harlan JM, Lui D, eds. *Adhesion: Its Role in Inflammatory Disease*. New York, WH Freeman, 1992:117-150.
62. Movat HZ. The role of endothelium in leukocytes emigration: the views of Cohnheim, Metchnikoff and their contemporaries. *Pathol Immunopathol Res* 1989;8(1):35-41.
63. Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) to specificity and diversity. *Cell* 1991 Dec 20;67(6):1033-6
64. Lawrence MB, Springer TA. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 1991 May 31;65(5):859-73.
65. Von Andrian UH, Hansell P, Chambers JD, et al. L-selectin function is required for beta 2-integrin-mediated neutrophil adhesion at physiological shear rates in vivo. *Am J Physiol*. 1992 Oct;263(4 Pt 2):H1034-44.
66. Kubes P, Ibbotson G, Russell J, et al. Role of platelet-activating factor in ischemia/reperfusion-induced leukocyte adherence. *Am J Physiol*. 1990 Aug;259(2 Pt 1):G300-5.

67. Suzuki M, Inauen W, Kvietys PR. Superoxide mediates reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions. *Am J Physiol.* 1989 Nov;257(5 Pt 2):H1740-5.
68. Harlan JM. Neutrophil-mediated vascular injury. *Acta Med Scand Suppl* 1987;715:123-9.
69. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974 Dec;54(6):1496-508.
70. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, et al. Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation.* 1983 May;67(5):1016-23.
71. Vedder NB, Winn RK, Rice CL, et al. Inhibition of leukocyte adherence by anti-CD18 monoclonal antibody attenuates reperfusion injury in the rabbit ear. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Apr;87(7):2643-6.
72. Noguchi N, Watanabe A, Shi H. Diverse functions of antioxidants. *Free Radic Res* 2000 Dec, 33(6): 809-17.
73. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, et al. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg.* 1985 Mar;201(3):357-9.
74. Nijveldt RJ, van Nood E, van Hoorn DE, et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin Nutr.* 2001 Oct;74(4):418-25.
75. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol.* 2000 Apr 1;59(7):865-70.
76. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leukocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol.* 1994 Oct;267(4 Pt 1):G562-8.
77. Davenpeck KL, Gauthier TW, Lefer AM. Inhibition of endothelial-derived nitric oxide promotes P-selectin expression and actions in the rat microcirculation. *Gastroenterology.* 1994 Oct;107(4):1050-8.

78. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1997 Oct;100(5):1227-33.
79. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY. Use of a nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia-reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Nov;102(6):2040-8; discussion 2049-51.
80. Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol.* 1997 Jan;272(1 Pt 2):F48-54.
81. Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, et al. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther.* 1992 Feb;260(2):668-75.
82. Emerson DJ, Sykes PJ. The effect of prostacyclin on experimental random pattern flaps in the rat. *Br J Plast Surg.* 1981 Jul;34(3):264-6.
83. Senderoff DM, Israeli D, Zhang WX, et al. .Iloprost improves survival of ischemic experimental skin flaps. *Ann Plast Surg.* 1994 May;32(5):490-5.
84. Mellow CG, Knight KR, Angel MF, et al. The effect of thromboxane synthetase inhibition on tolerance of skin flaps to secondary ischemia caused by venous obstruction. *Plast Reconstr Surg.* 1990 Aug;86(2):329-34.
85. Bortolotto SK, Morrison WA, Han X, et al. Mast cells play a pivotal role in ischaemia reperfusion injury to skeletal muscles. *Lab Invest.* 2004 Sep;84(9):1103-11.
86. Braganza JM. Mast cell: pivotal player in lethal acute pancreatitis. *QJM.* 2000 Jul;93(7):469-76.
87. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. İmmun sistem bozuklukları. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editörler; *Temel Patoloji.* Altıncı edisyon. (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 81-131.
88. Cordeiro PG, Lee JJ, Mastorakos D, Hu QY, Pinto JT, Santamaria E. Prevention of ischemia-reperfusion injury in a rat skin flap model: the role of mast cells, cromolyn sodium, and histamine receptor blockade. *Plast Reconstr Surg.* 2000 Feb;105(2):654-9.

89. Gastman BR, Futrell JW, Manders EK. Apoptosis and plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*. 2003 Apr 1;111(4):1481-96. Review.
90. Nagata S. Apoptosis by death factor. *Cell*. 1997 Feb 7;88(3):355-65.
91. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. Neoplazi. Kumar V, Cotran RS, Robbins SL, editörler; Temel Patoloji. Altıncı edisyon. (içinde). İstanbul: Nobel Tıp Kitapevleri, 2000: 132-174.
92. Saikumar P, Dong Z, Weinberg JM, et al. Mechanisms of cell death in hypoxia/reoxygenation injury. *Oncogene*. 1998 Dec 24;17(25):3341-9
93. Yaoita H, Ogawa K, Maehara K, et al. Attenuation of ischemia/reperfusion injury in rats by a caspase inhibitor. *Circulation*. 1998 Jan 27;97(3):276-81.
94. Hockenbery DM, Oltvai ZN, Yin XM, et al. Bcl-2 functions in an antioxidant pathway to prevent apoptosis. *Cell*. 1993 Oct 22;75(2):241-51.
95. Pepe S. Mitochondrial function in ischaemia and reperfusion of the ageing heart. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2000 Sep;27(9):745-50.
96. Sumer BD, Gastman BR, Gao F, et al. Caspase inhibition enhances ischemic tolerance of fasciocutaneous flaps. *Laryngoscope*. 2005;115:1358-61.
97. Sasaki H, Matsuno T, Tanaka N, et al. Activation of apoptosis during the reperfusion phase after rat liver ischemia. *Transplant Proceed* 1996;28:1908-9.
98. Gao W, Bentley RC, Madden JF, et al. Apoptosis of sinusoidal endothelial cells is a critical mechanism of preservation injury in rat liver transplantation. *Hepatology* 1998;27:1652-60.
99. Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, et al. A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis. *Faseb J* 1999;13:253-61.
100. Kohli V, Selzner M, Madden JF, et al. Endothelial cell and hepatocyte deaths occur by apoptosis after ischemia-reperfusion injury in the rat liver. *Transplantation* 1999;67:1099-105.

101. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, et al. Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis? *Hepatology*. 2001 Feb;33(2):397-405.
102. Jaeschke H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death. *Transplant Proc* 2002;34:2656-8.
103. Kopp P. Resveratrol, a phytoestrogen found in red wine. A possible explanation for the conundrum of the 'French paradox'? *Eur J Endocrinol*. 1998 Jun;138(6):619-20.
104. Soleas GJ, Diamandis EP, Goldberg DM. Resveratrol: a molecule whose time has come? And gone? *Clin Biochem*. 1997 Mar;30(2):91-113.
105. Tokuşoglu O, Unal MK, Yemiş F. Determination of the phytoalexin resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene) in peanuts and pistachios by high-performance liquid chromatographic diode array (HPLC-DAD) and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). *J Agric Food Chem*. 2005 Jun 15;53(12):5003-9.
106. Goldberg DM, Tsang E, Karumanchiri A, et al. Method to assay the concentrations of phenolic constituents of biological interest in wines. *Anal Chem*. 1996 May 15;68(10):1688-94.
107. Boocock DJ, Faust GE, Patel KR, et al. Phase I dose escalation pharmacokinetic study in healthy volunteers of resveratrol, a potential cancer chemopreventive agent. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007 Jun;16(6):1246-52.
108. Nigdikar SV, Williams Nr, Griffin BA, et al. Consumption of red wine polyphenols reduces the susceptibility of low-density lipoproteins to oxidation in vivo. *Am J Clin Nutr*. Aug 1998;68(2):258-265.
109. Murcia MA, Martínez-Tomé M. Antioxidant activity of resveratrol compared with common food additives. *J Food Prot*. 2001 Mar;64(3):379-84.
110. Tsai SH, Lin-Shiau SY, Lin JK. Suppression of nitric oxide synthase and the down-regulation of the activation of NFkappaB in macrophages by resveratrol. *Br J Pharmacol*. 1999 Feb;126(3):673-80.

111. Jang M, Cai L, Udeani GO, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. *Science*. 1997 Jan 10;275(5297):218-20.
112. Martinez J, Moreno JJ. Effect of resveratrol, a natural polyphenolic compound, on reactive oxygen species and prostaglandin production. *Biochem Pharmacol*. 2000 Apr 1;59(7):865-70.
113. Kimura Y, Okuda H, Arichi S. Effects of stilbene derivatives on arachidonate metabolism in leukocytes. *Biochim Biophys Acta*. 1985 Nov 14;837(2):209-12.
114. Marier JF, Chen K, Prince P, et al. Production of ex vivo lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1beta, and interleukin-6 is suppressed by trans-resveratrol in a concentration-dependent manner. *Can J Vet Res*. 2005 Apr;69(2):151-4.
115. Ferrero ME, Bertelli AE, Fulgenzi A, et al. Activity in vitro of resveratrol on granulocyte and monocyte adhesion to endothelium. *Am J Clin Nutr*. 1998 Dec;68(6):1208-14.
116. Pervaiz S. Chemotherapeutic potential of the chemopreventive phytoalexin resveratrol. *Drug Resist Updat*. 2004 Dec;7(6):333-44. Epub 2004 Dec 19.
117. Ma ZH, Ma QY, Wang LC, et al. Effect of resveratrol on peritoneal macrophages in rats with severe acute pancreatitis. *Inflamm Res*. 2005 Dec;54(12):522-7.
118. Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 1995 Mar 31;235(2):207-19.
119. Chen CK, Pace-Asciak CR. Vasorelaxing activity of resveratrol and quercetin in isolated rat aorta. *Gen Pharmacol*. 1996 Mar;27(2):363-6.
120. Ferrara N. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev*. 2004 Aug;25(4):581-611.

121. Terman BI, Carrion ME, Kovacs E, et al. Identification of a new endothelial cell growth factor receptor tyrosine kinase. *Oncogene*. 1991 Sep;6(9):1677-83.
122. Wang H, Zhou H, Zou Y, et al. Resveratrol modulates angiogenesis through the GSK3 β / β -catenin/TCF-dependent pathway in human endothelial cells. *Biochem Pharmacol*. 2010 Nov 1;80(9):1386-95. Epub 2010 Aug 7.
123. Park SY, Jeong KJ, Lee J, et al. Hypoxia enhances LPA-induced HIF-1 α and VEGF expression: their inhibition by resveratrol. *Cancer Lett*. 2007 Dec 8;258(1):63-9. Epub 2007 Oct 4.
124. Zhang Q, Tang X, Lu QY, et al. Resveratrol inhibits hypoxia-induced accumulation of hypoxia-inducible factor-1 α and VEGF expression in human tongue squamous cell carcinoma and hepatoma cells. *Mol Cancer Ther*. 2005 Oct;4(10):1465-74.
125. Ahmad KA, Clement MV, Hanif IM, et al. Resveratrol inhibits drug-induced apoptosis in human leukemia cells by creating an intracellular milieu nonpermissive for death execution. *Cancer Res*. 2004 Feb 15;64(4):1452-9.
126. Ahmad KA, Clement MV, Pervaiz S. Pro-oxidant activity of low doses of resveratrol inhibits hydrogen peroxide-induced apoptosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2003 Dec;1010:365-73.
127. Delmas D, Rébé C, Lacour S, et al. Resveratrol-induced apoptosis is associated with Fas redistribution in the rafts and the formation of a death-inducing signaling complex in colon cancer cells. *J Biol Chem*. 2003 Oct 17;278(42):41482-90. Epub 2003 Aug 5.
128. Dörrie J, Gerauer H, Wachter Y, et al. Resveratrol induces extensive apoptosis by depolarizing mitochondrial membranes and activating caspase-9 in acute lymphoblastic leukemia cells. *Cancer Res*. 2001 Jun 15;61(12):4731-9.
129. Jazirehi AR, Bonavida B. Resveratrol modifies the expression of apoptotic regulatory proteins and sensitizes non-Hodgkin's lymphoma

- and multiple myeloma cell lines to paclitaxel-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther.* 2004 Jan;3(1):71-84.
130. Draczynska-Lusiak B, Doung A, et al. Oxidized lipoproteins may play a role in neuronal cell death in Alzheimer disease. *Mol Chem Neuropathol.* 1998 Feb;33(2):139-48.
131. Ungvari Z, Orosz Z, Rivera A, et al. Resveratrol increases vascular oxidative stress resistance. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2007 May;292(5):H2417-24. Epub 2007 Jan 12.
132. Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, et al. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *J Biol Chem.* 1998 Aug 21;273(34):21875-82.
133. Fontecave M, Lepoivre M, Elleingand E, et al. Resveratrol, a remarkable inhibitor of ribonucleotide reductase. *FEBS Lett.* 1998 Jan 16;421(3):277-9.
134. Ciolino HP, Daschner PJ, Yeh GC. Resveratrol inhibits transcription of CYP1A1 in vitro by preventing activation of the aryl hydrocarbon receptor. *Cancer Res.* 1998 Dec 15;58(24):5707-12.
135. Jang M, Pezzuto JM. Cancer chemopreventive activity of resveratrol. *Drugs Exp Clin Res.* 1999;25(2-3):65-77.
136. Gehm BD, McAndrews JM, Chien PY, et al. Resveratrol, a polyphenolic compound found in grapes and wine, is an agonist for the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997 Dec 9;94(25):14138-43.
137. Mgbonyebi OP, Russo J, Russo IH. Antiproliferative effect of synthetic resveratrol on human breast epithelial cells. *Int J Oncol.* 1998 Apr;12(4):865-9.
138. Galati G, Sabzevari O, Wilson JX, O'Brien PJ. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. *Toxicology.* 2002 Aug 1;177(1):91-104.

139. Hassan-Khabbar S, Cottart CH, Wendum D, et al. Postischemic treatment by trans-resveratrol in rat liver ischemia-reperfusion: a possible strategy in liver surgery. *Liver Transpl.* 2008 Apr;14(4):451-9.
140. Juan ME, Vinardell MP, Planas JM. The daily oral administration of high doses of trans-resveratrol to rats for 28 days is not harmful. *J Nutr.* 2002 Feb;132(2):257-60.
141. Crowell JA, Korytko PJ, Morrissey RL, et al. Resveratrol-associated renal toxicity. *Toxicol Sci.* 2004 Dec;82(2):614-9. Epub 2004 Aug 25.
142. Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2005: 465-9.
143. Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2005: 57-63.
144. Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi.* İstanbul: Nobel Tıp Kitabevi, 2005: 90-92.
145. Dunn RM, Mancoll J. Flap models in the rat: a review and reappraisal. *Plast Reconstr Surg.* 1992 Aug;90(2):319-28.
146. Rand-Luby L, Pommier RF, Williams ST, et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. *Ann Surg.* 1996 Oct;224(4):583-9; discussion 589-90.
147. Mathes SJ, Hansen SL. Flap classification and applications. In: Mathes SJ, editor. *Plastic Surgery*, 2nd ed. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc; 2006: Vol1, 365-481.
148. Manson PN, Narayan KK, Im MJ, et al. Improved survival in free skin flap transfers in rats. *Surgery.* 1986 Feb;99(2):211-5.
149. Tamir G, Yaffe B, Pri-Chen S, et al. The effect of allopurinol on experimental island skin flap survival under prolonged periods of arterial ischaemia. *Br J Plast Surg.* 1994 Apr;47(3):155-7.
150. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, et al. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg.* 1986 Oct;39(4):469-72.

151. Kwon ST, Jeong JH, Eun SC, et al. The effects of mega-dose ascorbic acid on skin flap survival: experimental study on rats. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009 Dec;62(12):e641-2. Epub 2009 Feb 1.
152. Kubes P, Hunter J, Granger DN. Effects of cyclosporin A and FK506 on ischemia/reperfusion-induced neutrophil infiltration in the cat. *Dig Dis Sci*. 1991 Oct;36(10):1469-72.
153. Mihelcic D, Schleiffenbaum B, Tedder TF, et al. Inhibition of leukocyte L-selectin function with a monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *Blood*. 1994 Oct 1;84(7):2322-8.
154. Khiabani KT, Kerrigan CL. The effects of the nitric oxide donor SIN-1 on ischemia-reperfused cutaneous and myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2002 Jul;110(1):169-76.
155. Iwata A, Harlan JM, Vedder NB, et al. The caspase inhibitor z-VAD is more effective than CD18 adhesion blockade in reducing muscle ischemia-reperfusion injury: implication for clinical trials. *Blood*. 2002 Sep 15;100(6):2077-80.
156. Askar I, Oktay MF, Gurlek A, et al. Protective effects of some antineoplastic agents on ischemia-reperfusion injury in epigastric island skin flaps. *Microsurgery*. 2006;26(3):193-9.
157. Bilen BT, Kiliç H, Alaybeyoglu N, et al. Effect of caffeic acid phenethyl ester on survival of axial pattern flaps in rats with ischaemia-reperfusion injuries. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*. 2006;40(2):73-8.
158. Gideroglu K, Yilmaz F, Aksoy F, et al. Montelukast protects axial pattern rat skin flaps against ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2009 Dec;157(2):181-6. Epub 2008 Aug 27.
159. Huang SS, Tsai MC, Chih CL, et al. Resveratrol reduction of infarct size in Long-Evans rats subjected to focal cerebral ischemia. *Life Sci*. 2001 Jul 20;69(9):1057-65.

160. Kiziltepe U, Turan NN,. Resveratrol, a red wine polyphenol, protects spinal cord from ischemia-reperfusion injury. *J Vasc Surg.* 2004 Jul;40(1):138-45.
161. Kaplan S, Bisleri G, Morgan JA, et al. Resveratrol, a natural red wine polyphenol, reduces ischemia-reperfusion-induced spinal cord injury. *Ann Thorac Surg.* 2005 Dec;80(6):2242-9.
162. Walle T, Hsieh F, DeLegge MH, et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. *Drug Metab Dispos.* 2004 Dec;32(12):1377-82. Epub 2004 Aug 27.
163. Wenzel E, Somoza V. Metabolism and bioavailability of trans-resveratrol. *Mol Nutr Food Res.* 2005 May;49(5):472-81.
164. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery.* 2004;24(6):468-75.
165. Cetinkale O, Bilgic L, Bolayirli M, et al. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Jul;102(1):153-60.
166. Zhang F, Hu EC, Topp S, et al. Proinflammatory cytokines gene expression in skin flaps with arterial and venous ischemia in rats. *J Reconstr Microsurg.* 2006 Nov;22(8):641-7.
167. Bujanda L, García-Barcina M, Gutiérrez-de Juan V, et al. Effect of resveratrol on alcohol-induced mortality and liver lesions in mice. *BMC Gastroenterol.* 2006 Nov 14;6:35.
168. Padubidri A, Browne E Jr. Effect of vascular endothelial growth factor (VEGF) on survival of random extension of axial pattern skin flaps in the rat. *Ann Plast Surg.* 1996 Dec;37(6):604-11.
169. Taub PJ, Marmur JD, Zhang WX, et al. Locally administered vascular endothelial growth factor cDNA increases survival of ischemic experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1998 Nov;102(6):2033-9.

170. Brauchle M, Funk JO, Kind P, et al. Ultraviolet B and H₂O₂ are potent inducers of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes. *J Biol Chem*. 1996 Sep 6;271(36):21793-7.
171. Kuroki M, Voest EE, Amano S, et al. Reactive oxygen intermediates increase vascular endothelial growth factor expression in vitro and in vivo. *J Clin Invest*. 1996 Oct 1;98(7):1667-75.

