

**T. C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SIÇAN SIRTINDA OLUŞTURULAN DORSAL RANDOM
PATERNLİ DERİ FLEBİNDE LUTEOLİN' İN
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ VE İSKEMİ – REPERFÜZYON
HASARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. Mehmet SÖNMEZ

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat EMİROĞLU**

**ANKARA
2013**

**T. C.
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SIÇAN SIRTINDA OLUŞTURULAN DORSAL RANDOM
PATERNLİ DERİ FLEBİNDE LUTEOLİN' İN
FLEP YAŞAYABİLİRLİĞİ VE İSKEMİ – REPERFÜZYON
HASARI ÜZERİNE OLAN ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI
(DENEYSEL ÇALIŞMA)**

Dr. Mehmet SÖNMEZ

**PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ
ANABİLİM DALI
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Murat EMİROĞLU**

**ANKARA
2013**

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

Tıpta Uzmanlık eğitimi çerçevesinde yürütülmüş olan ‘**Sıçan Sirtında Oluşturulan Dorsal Random Paternli Deri Flebinde Luteolin’in Flep Yaşayabilirliği ve İskemi – Reperfüzyon Hasarı Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması**’ başlıklı, Dr. Mehmet Sönmez’e ait bu çalışma aşağıdaki jüri tarafından Tıpta Uzmanlık Tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 10/10/2013

Prof. Dr. Murat Emiroğlu
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim/Bilim Dalı
Tez Danışmanı- Jüri Başkanı

Prof. Dr. Kutlu Sevin
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik
Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

Doç. Dr. Savaş Serel
Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik
Cerrahi Anabilim Dalı
Jüri Üyesi

ÖNSÖZ

Sevgi ve heyecanla başladığım Ankara Üniversitesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'ndaki uzmanlık eğitimim esnasında bilgi ve tecrübelerini benden esirgemeyen, tıp etiği ve ahlakları ile her zaman örnek olan sayın hocalarım Prof. Dr. Erdem Yormuk, Prof. Dr. Mustafa Rıza Özbek, Prof. Dr. Kutlu Sevin, Prof. Dr. Serdar Mehmet Gültan, Prof. Dr. Murat Emiroğlu, Prof. Dr. Zeki Can ve Doç. Dr. Savaş Serel'e sonsuz teşekkürlerimi bir borç bilirim.

Tezin oluşmasında emeği olan Op. Dr. Burak Kaya'ya, Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Aslıhan Avcı' ya, Histoloji-Embriyoloji Anabilim Dalı'ndan Prof. Dr. Nurşen Saraç'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı'ndan Dr. Selcen Pehlivanoğlu'na ayrıca teşekkürlerimi sunarım.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım ve zorluklarla dolu asistanlık eğitimini kolaylaştıran asistan arkadaşlarıma, hemşirelere ve personele teşekkür ederim.

Önsözümü bitirirken, hayatımda büyük öneme sahip olan eşime ve oğluma desteklerini her zaman hissettirdikleri için teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	iii
Önsöz	iv
İçindekiler	v
Kısaltmalar Dizini	vii
Şekiller Dizini	viii
Tablolar Dizini	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	2
2.1 Flep Fizyolojisi	2
2.2 Sıçan Dorsal Yarımada Flebi	5
2.3 Luteolin ve Etki Mekanizması	7
3. GEREÇ ve YÖNTEM	10
3.1 Deney Hayvanları	10
3.2 Gereçler	10
3.3 Yöntem	12
3.3.1 Çalışma Grupları	12
3.3.2 Cerrahi Teknik	12
3.4. Değerlendirme Yöntemleri	16
3.4.1 Biyokimyasal İnceleme	16
3.4.1.1 Malondialdehid Seviyeleri	16
3.4.1.2 Katalaz Seviyeleri	17
3.4.1.3 Nitrik Oksit Seviyeleri	17
3.4.1.4 Ksantin Oksidaz Seviyeleri	17
3.4.2 Flep Nekroz Alanı	17
3.4.3 Histopatolojik Değerlendirme	18
3.4.4 İstatistiksel Değerlendirme	19
4. BULGULAR	20
4.2 Flep Nekroz Alanı Bulguları	23
4.3 Histopatolojik Bulgular	24

5. TARTIŞMA	33
6. SONUÇLAR	40
ÖZET	41
SUMMARY	42
KAYNAKLAR	43

KISALTMALAR DİZİNİ

ATP	: Adenozin trifosfat
Na:K ATP'az	: Sodyum-potasyum adenozintrifosfataz
NADH2	: Nikotinamid adenin dinükleotid'in indirgenmiş formu
XO	: Ksantin oksidaz
H2O2	: Hidrojen peroksit
GSH – Px	: Glutasyon peroksidaz
KAT	: Katalaz
TNF-α	: Tümör nekrozis faktör alfa
IL-1	: İnterlökin 1
IL-6	: İnterlökin 6
IL-8	: İnterlökin 8
NO	: Nitrik oksit
FDA	: 'Food and Drug Administration'
MDA	: Malondialdehid
SOD	: Superoksit dismutaz
XO	: Ksantin oksidaz
PMNL	: Polimorfonükleer lökosit
VEGF	: Vasküler endoteliyal büyüme faktörü

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1: Çalışmada kullanılacak olan 3x10 cm boyutlu, kraniyal tabanlı, random paternli sırt yarımada flebi	7
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan preparat; Luteolin (Cayman Chemical).	11
Şekil 3.2: Sıçan dorsumunun planlama öncesi hazırlanması	13
Şekil 3.3: Sıçan dorsumunda 3x10 cm'lik kaudal tabanlı flebin planlanması	14
Şekil 3.4: Flebin kaldırılması	14
Şekil 3.5: Fleplerden biyokimyasal inceleme için doku örneği alınması ve tüplere aktarımı	15
Şekil 3.6: Operasyon sonrası 7. günde flepte nekroz oranlarının planimetrik olarak hesaplanması	15
Şekil 3.7: Operasyon sonrası 7. günde flepten histopatolojik inceleme için örnek alınması	16
Şekil 4.1: Kontrol grubunda postoperatif 7. günde görülen nekroz alanı	23
Şekil 4.2: Luteolin grubunda postoperatif 7. günde görülen nekroz alanı	23
Şekil 4.3: Kontrol gruplarına ait kesitlerde görünüm. A: Kontrol 3 nolu sıçan kesitlerinde kas ve dermiste yoğun infiltrasyon ve ödem görülmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme, artı: eritrositler, yıldız: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, köşeli ayraç: kas hücreleri, çarpı: yağ hücreleri.) B: Kontrol 3 nolu sıçandan alınan bir diğer kesitte ödem varlığı daha belirgin bir şekilde göze çarpmaktadır. (Boya: H-E, x20 büyütme, daire: kıl folikülleri, dikdörtgen: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ok: kan damarı, üçgen: ödem.) C: Kontrol 5 nolu sıçandan alınan kesitte belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz oluşumu görülmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme, karo: inflamatuvar hücreler, eğri ok: nekroz odakları.)	26-27
Şekil 4.4: Luteolin gruplarına ait kesitlerde görünüm. A: Deney 1 nolu sıçan kesitlerinde epitelin sağlamlığı, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun oldukça az ve fibrozis varlığı görülmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme) B: Deney 6 nolu sıçandan alınan kesitte tamamen normal doku özelliklerinin korunduğu görülmektedir. Fibrozis varlığı dikkati çekmektedir. (Boya:H-E, x10 büyütme,) C: Deney 8 nolu sıçandan alınan kesitte belirgin fibrozis, epitelde bütünlük ve nekrozun olmaması dikkati çekmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme) (artı: epitel, eğri ok: inflamatuvar hücreler, çarpı: deri ekleri, üçgen: kas dokusu, elmas: yağ dokusu, düz ok: fibrozis)	28-29
Şekil 4.5: Deney 4 nolu sıçandan alınan kesitte normale yakın doku özelliklerinin yanı sıra yeni damar oluşumları dikkati çekiyor. (Boya: H-E, x20 büyütme, köşeli ok: yeni damar oluşumları)	30

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 3.1: Deney Grupları	12
Tablo 3.2: Histolojik değerlendirmeler yapılırken kullanılan skorlama sistemi	18
Tablo 4.1: Luteolin ve kontrol gruplarında katalaz enzimi düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	21
Tablo 4.2: Luteolin ve kontrol gruplarında malondialdehid düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	21
Tablo 4.3: Luteolin ve kontrol gruplarında ksantin oksidaz düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	22
Tablo 4.4: Luteolin ve kontrol gruplarında nitrik oksit düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	24
Tablo 4.5: Postoperatif 7. günde luteolin ve kontrol gruplarında flep nekroz oranlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması (Mann Whitney U)	24
Tablo 4.6: Kontrol grubunda dermiste ödem, PMNL - lenfosit infiltrasyonu, nekroz ve fibrozis parametrelerinin skorlanması	25
Tablo 4.7: Luteolin grubunda dermiste ödem, PMNL - lenfosit infiltrasyonu, nekroz ve fibrozis parametrelerinin skorlanması	25
Tablo 4.8: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik ödem düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	31
Tablo 4.9: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik inflamatuvar hücre düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	31
Tablo 4.10: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik nekroz düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	32
Tablo 4.11: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik fibrozis düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)	32

1. GİRİŞ

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin ana ilkelerinin başında insan vücudunun bütünlüğünün korunarak çeşitli nedenlerle oluşan doku eksikliğinin onarımında form ve fonksiyonun devamının sağlanması gelmektedir. Doku eksikliğinin giderilmesinde sıkça kullanılan flep, kanlanması bozulmadan aktarılan doku parçasına verilen isim olarak tanımlanır. Flep cerrahisindeki gelişmelere rağmen sık kullanımda olan random paternli fleplerde katı bir en:boy oranının gerekli olması flep uygulamalarında en önemli sınırlamalardan biridir. Distal iskemi, flep kaldırıldıktan sonra flebin distalinde akut olarak besleyici damarların yeterli kan akımı sağlayamadığı durumda oluşur. Distal iskemi sonucu tetiklenen iskemi – reperfüzyon hasarı sonucunda flepte doku ölümü oluşmakta, bu da klinik olarak uzamış hasta yatış süresi ve artan maliyetlere neden olmaktadır. Bu nedenle flep cerrahisinde flep nekrozunun temel nedenlerinden olan iskemi – reperfüzyon hasarını kimyasal ajanlarla ve diğer yöntemlerle durdurmak veya azaltmaya yönelik çalışmalar sürdürülmektedir. Aynı zamanda, cildin beslenme paterninin ortaya konması, anjiyozom konseptinin ortaya atılması ile birlikte çalışmalar deri fleplerinin yaşayabilirliğini artıracak yöntemleri bulmaya yönelmiştir.

Luteolin, hidroksile flavinoid yapısındadır, antioksidan ve serbest radikal tutucu özellikleri mevcuttur. İskemi – reperfüzyon hasarında doku hasarının temelinin serbest radikal oluşumu ve doku oksidasyonunun oluşturduğundan hareketle yapılan çalışmalarda luteolin'in rat kalp kası, sinir hücreleri ve karaciğer hücrelerinde oluşturulan iskemi – reperfüzyon hasarı modellerinde olumlu etkileri gösterilmiştir.

Bu çalışmada, sıçan sırtında oluşturulan random paternli deri flebi modelinde luteolin'in iskemi – reperfüzyon hasarı ve flep yaşayabilirliğine olan etkisinin incelenmesi amaçlanmıştır. Yapılan bu çalışma, flep cerrahisinde iskemi – reperfüzyon hasarını azaltarak artmış flep sağkalımını göstererek ileride yapılacak çalışmalar öncesi bir ön çalışma niteliğindedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.Flep Fizyolojisi

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin en önemli uygulamalarından olan flep cerrahisinde başarının anahtarı derinin kanlanma paterni, kan akımını etkileyen mekanizmalar, iskemik fleplerin fizyopatolojik süreçlerinin bilinmesi ve bu bilgiler ışığında doğru flep planlaması ve postoperatif takibin yapılmasından geçmektedir.

Mc Gregor ve Morgan, flepleri random paternli ve aksiyel paternli olmak üzere iki grupta tanımlamışlar (1). Random paternli flep, bilinen besleyici damarı olmayan, kaldırıldığı andan sonra içerdiği dokudaki pleksuslardan beslenen flebi ifade etmektedir.

Derinin kanlanma yapısı hakkında Taylor ve Palmer iki teori ortaya atmışlardır: Anjiozom konsepti ve Fasiyokutanöz pleksus (2). Anjiozom konseptine göre, vücutta farklı derin damarlardan beslenen 40 anjiozom bölgesi mevcuttur ve bu anjiozomlar birbirleriyle gerçek anastomozlarla veya “choke” anastomotik damarları denen daha küçük çaplı ve flep geciktirme veya sempatik tonusun azalması ile açılan damarlarla birbirlerine bağlıdır. Fasiyokutanöz pleksus ise subfasial, intrafasial, suprafasial, subkutanöz ve subdermal vasküler ağlar ve birbirleriyle olan bağlantılarından oluşmaktadır. Nakajima ve arkadaşları ise bu ağı besleyen altı farklı damar tipi tanımlamışlardır (3). Diğer yandan cildin venöz drenajı için de iki sistem tanımlanmıştır: arterlere komşu valvüler süperfasiyal ve derin venler ve avalvüler, bölgeler arası bağlantı sağlayan osilatuar venler (4). Osilatuar venler deri fleplerinin distal kısmında oluşan venöz akım yetersizliğini önlemektedir. Random paternli deri fleplerinde mikrodolaşımı etkileyen faktörler flebin sağkalımını önemli düzeyde etkilemektedir. Random paternli deri flebi kaldırılırken 2:1 boy:en oranı kuralına uyulması gerekir. Bu oranın uzunluk lehine bozulması flep distalinde dolaşım yetersizliğine, bu da bir takım histopatolojik süreçleri tetikleyerek flep distalinde nekroza sebep olmaktadır.

Mikrodolaşımında, sistemik ve lokal faktörler cilde gelen kan akımını kontrol etmektedir (5). Sistemik kontrolde nöral ve humoral regülasyon rol oynamaktadır.

Nöral regülasyon primer olarak sempatik adrenerjik lifler yoluyla sağlanmaktadır. Alfa adrenerjik lifler vazokonstrüksiyona, beta adrenerjik lifler vazodilatasyona sebep olmaktadır. Sempatik adrenerjik lifler arterler, arterioller ve arteriovenöz anastomozlarda yer alan vasküler düz kasta bazal tonustan sorumludur. Daha az etkin olan kolinerjik lifler de bradikinin salınımı ve vazodilatasyondan sorumludurlar. Humoral regülasyon ise vazokonstrüksiyon ve vazodilatasyon sağlayan mediatörler vasıtasıyla gerçekleşmektedir. Epinefrin, norepinefrin, serotonin, tromboksan A2 ve prostoglandin F2 alfa vazokonstrüksiyondan, bradikinin, histamin ve prostoglandin E1 vazodilatasyondan sorumludur. Lokal kontrolde ise metabolik ve fiziksel faktörler etkilidir. Hiperkapni, hipoksi, asidoz ve hiperkalemi lokal metabolik faktörler arasındadır. Fiziksel faktörler arasında deri için önemli olan faktör hipotermi durumudur. Hipotermi durumunda vazokonstrüksiyon olarak kan akımı düşer. Diğer yandan miyojenik refleks mekanizmasıyla izole olarak deri damarlarında vazokonstrüksiyon tetiklenerek arteriyel basınçtan bağımsız olarak kapiller akım sürdürülebilmektedir. Yine artmış kan viskozitesi de kan akımını azaltmaktadır. Sonuç olarak, deri düzeyinde sempatik tonus kanlanmada birincil etkili mekanizmadır, epinefrin vazokonstrüksiyona sebep olur, sıcaklık değişimleri cildin kanlanmasında önemli yere sahiptir ve lokal kontrol de etkilidir.

Bir deri flebinin kaldırılması sonrasında bir takım akut değişiklikler ortaya çıkar. Öncelikli olarak, kan akımının kontrolünü sağlayan sempatik innervasyon ortadan kalkmakta ve bu da vazokonstrüksiyona sebep olmaktadır (6). Vazokonstrüksiyon da flebin distal kısımlarında hipoperfüzyona ve ikincil olarak iskemiye sebep olmaktadır. İskemi sonucunda lokal olarak adenozintrifosfat (ATP) düzeyleri azalır, bu da hücrelerin sağkalımında yaşamsal öneme sahip olan sodyum: potasyum adenozintrifosfataz (Na:K ATP'az) pompasının çalışmasını engelleyerek hücre içi sodyum ve kalsiyum düzeylerinin artmasına neden olur. Diğer yandan, lokal olarak ATP düzeylerinin azalması doku metabolizmasının anaerobik yapılmasına neden olur ve böylece dokuda laktik asit seviyeleri artar, pH düzeyi düşer. Hem intrasellüler pH'ın düşmesi hem de kalsiyum artışı proinflatuar sitokinlerin salınımına, endotel hücrelerinin aktivasyonuna, lökositlerden özellikle polimorf nüveli lökositlerin dokuya göç etmelerine, trombosit aktivasyonuna neden

olmaktadır. Düşük intraselüler pH aynı zamanda hücrenin kendisi için de sitotoksiktir. Ayrıca ATP yıkımı ile oluşan adenozin, hücre dışına çıkar ve hücre dışında inozin ve hipoksantin birikimine neden olur. Biriken inozin ve hipoksantin normal şartlarda ksantin dehidrogenaz enzimi ile ürik asite ve ksantine dönüşürken, iskemik dokuda yeterli nikotinamid adenin dinükleotid'in indirgenmiş formu (NADH₂) olmadığı için hipoksantin olarak birikir. Eğer reperfüzyon dokunun tolerans zamanı içerisinde gerçekleşmezse erken reperfüzyonda oksijen ve ksantin oksidaz (XO) enzimi vasıtasıyla hipoksantinden ürik asit ve hidrojen peroksit oluşur (7). Hidrojen peroksit (H₂O₂) ise normal koşullarda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) ve katalaz (KAT) yoluyla oksijene indirgenir. Ksantin oksidaz ve katalaz enzimlerinin dokuda yüksek miktarda saptanması yukarıda bahsedildiği gibi dokuda biriken hipoksantini ve hidrojen peroksiti toksik olmayan metabolitlere çevirmesi sebebiyle dokuyu koruyucu yönde etki etmektedir. Dolayısıyla bu iki enzim düzeyleri iskemi – reperfüzyon hasarının artması ile korele olarak azalmaktadır. Bunun yanında, iskemik dokuda bahsedilen indirgenme reaksiyonlarının kapasitesi aşıldıkça geçiş metalleri vasıtasıyla OH⁻ radikali oluşur. Bu molekül de makromoleküllerde oksidatif hasara neden olur. Bu bilgiler ışığında, doku kapasitesine ve iskeminin süresine göre ilk 12-24 saatte dokuda vazokonstriksiyon ve iskemiye sebep olan sempatik nörotransmitterler tükenerek kan akımı iyileşmekte bu aşamada dokuda ya normal reperfüzyon ya da daha büyük doku hasarına yol açan reperfüzyon hasarı ortaya çıkmaktadır. Reperfüzyon hasarında ise dört temel mekanizma rol oynamaktadır: Serbest radikaller, polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi ve endotel hücreleri. Erken reperfüzyonda normal durumda zaten vücutta oluşan ve nötralize edilen reaktif oksijen metabolitleri nötralize edilemeyip birikir, pH seviyesi artar ve önceden bahsedildiği gibi hücre içi kalsiyum düzeyleri artar. Bu da, normalde geçirgen olmayan mitokondri iç zarındaki mitokondriyal permeabilite geçiş porunun açılmasını sağlar. Mitokondri şişer, membranı depolarize olur ve sonunda dış zar yırtılarak sitokrom c gibi proapoptotik moleküller hücre içerisine salınarak hücre hasarı başlar. Yani, reperfüzyon hasarında mitokondri önemli rol oynamaktadır (7). Aynı zamanda reaktif oksijen metabolitleri ile aktive olan endotelden salınan mediatörler vasıtasıyla nötrofiller dokuya geçerek inflamatuvar cevabı oluştururlar, böylece doku hasarı daha da belirgin hale gelir.

Serbest radikaller hücre membranlarında lipidlerin peroksidasyonuna yol açarlar. Bunun sonucunda dokuda peroksidasyon ürünleri (malondialdehid, dien konjugatları) birikir. Malondialdehid, lipid peroksidasyon ürünü olarak oksidatif hasarın gösterilmesinde sıkça kullanılmaktadır (8). Endotel hücreleri, homeostaz durumunda endoteliyal nitrik oksit sentaz vasıtasıyla nitrik oksit sentezlemektedirler. İskemi durumunda, nitrik oksit oluşumu için yeterli oksijen substrat olmadığı için nitrik oksit sentezlenemez ve seviyeleri düşer. Dolayısıyla iskemik hasar sırasında nitrik oksit seviyelerinin azalması beklenir. (7) Bu süreçler boyunca, flebin iskemik kısmına pedikülden doğrusal olarak akım sağlanmakta, inoskülasyon ve neovaskülarizasyon yoluyla da flep yatağından ek akım elde edilmektedir (9).

Sonuç olarak flep cerrahisinde başarıyı etkileyen ekstresek ve intrinsek olmak üzere birtakım faktörler vardır, bunlar arasında, uygunsuz flep dizaynı, iskemi-reperfüzyon hasarı, mikrodolaşımı olumsuz etkileyen sistemik durumlar (hipotansiyon, sepsis, sigara kullanımı, vazokonstrüktör ilaçlar) ve flebin basıya maruziyeti (uygunsuz pozisyon, hematoma, pedikülde katlanma) flepte değişken oranda nekroza yol açan önemli faktörlerdendir (5).

Bu bilgiler ışığında, elevasyon sonrasında dolaşımı bozulan flebin inkomplet iskemik alanlarının kurtarılması, normal reperfüzyon fazına girmesi ve dolayısı ile flep nekrozlarının engellenebilmesi için yukarıda bahsedilen tüm faktörlere yönelik çalışmalar sürmektedir.

2.2. Sıçan Dorsal Yarımada Flebi

Sıçan, deri anatomisi insana göre farklı olmasına rağmen, düşük maliyetle birçok araştırma yapılabilmesinden dolayı araştırmalarda en çok tercih edilen deney hayvanıdır. 'Otokanibalizasyon', yani sıçanın kendi dokularını yemesi olayının sıçanlarda görülebilmesi önemli bir sorundur. 'Otokanibalizasyonu' engellemek için sırt bölgesinden eleve edilen flep modelleri daha çok tercih edilmektedir (10).

Sıçan sırtında random paternli flep modeli ilk olarak 1965 yılında Robert McFarlane ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (11). McFarlane'in adıyla anılan bu model, flebin distalinde çalışmanın özelliğine göre yapılan müdahale ile nekroz

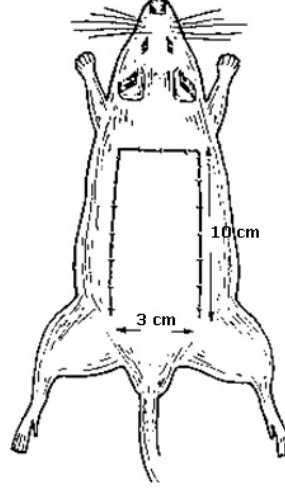
oranı değiştirilebilen bir zon oluşturması ve kolay hazırlanması nedenleriyle ilerleyen yıllarda değişikliklere uğramasına karşın yaygın kabul görmektedir (10).

McFarlane ve arkadaşları flep planlamasını sabit anatomik noktalara dayandırmaktaydı. Her iki skapula ve posterior iliak çıkıntılar işaretlenip, flep bu sabit noktalar arasını oluşturmaktaydı. Bu nedenle hayvanın byklğine bağlı olarak flep boyutları önemli oranda değişiklik göstermekteydi. Sabit anatomik noktaların referans alınması hayvan büyüklüğünden bağımsız olarak flebin hep aynı damarlardan beslenmesini sağladığı için bir üstünlük olarak ileri sürülmüş olmasına karşın nekroz alanları hep aynı büyüklükte olmuyordu. Yapılan bir diğer çalışmada McFarlane ve arkadaşlarının bulgularını destekler nitelikte fleplerde oluşan nekroz oranlarında belirgin bir tutarlılık saptanamadı (12). Bu çalışmadan hareketle istatistiksel olarak anlamlı sonuçlara ulaşmak için çok fazla hayvan kesilmesi gerekliliği sonucuna varıldı. Bu sebeple ilerleyen çalışmalar daha tutarlı nekroz oranları sağlayan flep modelleri oluşturulması yönünde yoğunlaştı.

Roger Khouri ve arkadaşları ise sırttaki yarımada fleplerinde tutarlı nekroz oranı sağlayıp modeli standardize etmek için eni 3 ve 4 cm olan iki farklı yarımada flep tasarımı kaudal ve kraniyal tabanlı olarak kullandılar. Yaptıkları çalışmalarda en tutarlı nekroz oranı kaudal ve kraniyal tabanlı hazırlanan 3 cm enindeki fleplerde ortaya ıktı (13,14). Nekroz oranının büyük varyasyonlar göstermemesi daha az sayıda hayvan kullanarak daha tutarlı istatistiksel sonuç almayı sağlayacağı için kaudal veya kraniyal tabanlı ‘dar’ flepler avantajlı kabul edildi. Bu modelde küçük tasarım değişiklikleri yapılabilmele birlikte daha tutarlı sonuçlar verdiği ve deney gruplarında daha az hayvanla istatistiksel olarak anlamlı sonuçların alınabildiği için halen sıkça tercih edilen bir yöntemdir (10).

Flebin elevasyonunda, flep kenarları deri altındaki pannikulus karnosus kası flebe dahil edilecek biçimde derin kas fasiyasına kadar kesilir, deri, derialtı ve pannikulus karnosus kasından oluşan flep, kas fasiyası üzerindeki gevşek ve nispeten damarsız anatomik planda kolayca ilerlenerek kaldırılır. Flebin kraniyal veya kaudal tabanlı olmasına göre kraniyal ya da kaudal kısımda flebe gelen dallar korunur ya da feda edilir. Kaldırılan flep yine aynı yere dikilir ve araştırma planına uygun biçimde izlenir ve değerlendirilir (şekil 2.1). Deri gibi çevresel faktörlerle kanlanması önemli lde değişebilen bir dokudan flep hazırlandığı için deney

yapılan ortamda oda sıcaklığı epiderminin mitotik aktivitesine uygun sıcaklıkta tutulmalı, soğğun vazokonstrüksiyon yaparak flep dolaşımını olumsuz etkileyeceği unutulmamalıdır (12).



Şekil 2.1: Çalışmada kullanılacak olan 3x10 cm boyutlu, kraniyal tabanlı, random paternli sırt yarımada flebi

2.3.Luteolin ve Etki mekanizması

Luteolin ve glikozid formları birçok bitki ailesinde doğal olarak bulunmaktadır. Diyetle alınan havuç, karabiber, nane, kekik, zeytinyağı, adaçayı, biberiye, kereviz gibi birçok bitkide bulunmaktadır (15). Kimyasal yapısı 3', 4', 5,7-tetrahidroksiflavon'dur. Luteolin'in bilinen en önemli özellikleri antiinflamatuvar, antioksidan ve sitoprotektif olmasıdır. Fareler üzerinde yapılan çalışmada luteolin'in selektif olarak indüklenabilir COX- 2 inhibisyonu yaptığı gösterilmiştir (16). Luteolin'in bir diğer etkisi de, inflamasyon yanıtının başlatılması ve sürdürülmesinde rol oynayan birtakım sitokinlerin (TNF, IL-1, IL-6, IL-8) salınmasını sağlayan nükleer faktör kappa beta transkripsiyonel sisteminin ekspresyonunu azaltması ve bu yolla hücre kültürlerinde de gösterilebilmiş bir antiinflamatuvar etkinlik göstermesidir (17).

Flavonların genel antioksidan aktivitesi bilinmektedir. Flavon halkasında bulunan iki noktadan biri serbest radikallere hidrojen veya elektron sağlayarak nötralizasyonda işlev görür, diğeri de serbest radikallerin oluşumunda rol oynayan

geçiş metalleri (bakır, demir) için bağlanma bölgesi oluşturur (18,19). Luteolin'de hidroksile flavinoid olmasından dolayı güçlü antioksidan özelliktedir (15). Aynı zamanda luteolin prooksidan enzimleri inhibe (20) ederek, antioksidan enzimleri de aktive (21) ederek antioksidan etkinlik gösterir. Bu özellikleri luteolin'i güçlü bir antioksidan yapmaktadır.

Yapılan bir çalışmada luteolin'in ratlarda koroner arter oklüzyonu öncesi uygulaması sonrası miyokardiyal enfarkt alanını küçülttüğü, doku laktat dehidrojenaz ve NO seviyelerini azalttığı ve antiaritmik etki göstererek mortaliteyi önemli ölçüde azalttığı gösterilmiştir (22). Fang ve ark.'da yaptıkları çalışmada luteolin'in miyokardiyal enfarkt alanını küçülttüğünü ve bunun yanında iskemi-reperfüzyon hasarında hücre ölümünün ana nedenlerinden biri olan apoptozis'i inhibe ettiğini göstermişlerdir (23). Yapılan bir diğer çalışmada da hücre kültürlerinde luteolin'in mikroglyal inflamasyonu inhibe ettiği ve nöroprotektif olduğu gösterilmiştir (24). Luteolin, bu etkilerini iNOS, COX-2, TNF- α , interleükin -1 β inhibisyonu aracılığıyla yapmaktadır (24). Yapılan bir diğer orijinal çalışmada da ratlarda luteolin'in karaciğer dokusunda iskemi-reperfüzyon hasarını serum MDA miktarını azaltarak, SOD aktivitesini artırarak engellediği gösterilmiştir (25).

Luteolin'in hücre koruyucu ve sinir dokuları üzerine koruyucu etkilerinden yola çıkılarak diğer flavinoidlerle kombine ticari preparatları bulunmaktadır ve bunlar çocuklarda otizm, erişkinlerde sinir harabiyeti ile giden hastalıklarda kullanılmaktadır, ancak luteolin şimdiye kadar 'Food and Drug Administration', 'Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi' (FDA) tarafından onaylanmamıştır. İnsanlar üzerinde yapılacak emilim, dağılım ve toksisite çalışmalarının yeterli oranda yapılması luteolin'in klinik kullanıma girmesini sağlayacaktır.

Luteolin'in ratlarda oral uygulamasında farmakokinetiği üzerine yapılan çalışmalar mevcuttur (26,27). Luteolin'in ratlarda oral tek doz uygulamasında iki kompartmanlı dağılıma uymaktadır. Plasma konsantrasyon – zaman eğrisinde 10 saate kadar varlığını sürdürmektedir (26). İntestinal absorpsiyonda luteolin'in öncelikle glukoronidle konjuge edilmektedir ve plazmada serbest, glukoronidle ve metille bağlı formları saptanmıştır. 15 dakika sonra plazma konsantrasyonu maksimuma ulaşmaktadır. Glukronid formları 24 saate kadar plazmada saptanabilmektedir (27).

Luteolin'in ratlarda intraperitoneal uygulaması mevcuttur (28). Bu uygulamada 10 mg/kg dozunda kullanılmıştır ve %0.9 serum fizyolojik ile sulandırılmıştır.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel tez çalışması için Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 17.11.2011 tarih ve 2011-124-488 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Histoloji-Emriyoloji Anabilim Dalı ve Klinik Biyokimya Anabilim Dalı'nın olanakları kullanılarak, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1 Deney Hayvanları

Çalışmada Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilmiş toplam 16 adet, ağırlıkları 250-350 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi erkek sıçan kullanıldı.

Sıçanlar hayvan laboratuvarında uygun kafeslerde, 21 +/-2 santigrat derece sıcaklıkta ve ışıkların saat 08:00'de yakılıp, saat 20:00 de söndürülmesiyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritminin sağlandığı koşullarda barındırıldı. Hayvanlar standart sıçan yemi ile beslendi, herhangi bir diyet ya da su kısıtlaması yapılmadı. Tüm hayvanlar ayrı kafeslerde barındırıldı.

3.2 Gereçler

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar:

- 1- Temel cerrahi aletler (pens, penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)
- 2- Steril enjektörler (1,2,5, 5, 10 cc)
- 3- Steril cerrahi eldiven
- 4- Steril cerrahi gazlı bez
- 5- Isıtmalı cerrahi deney masası
- 6- Povidone iodine
- 7- 3/0 keskin iğneli atravmatik cerrahi ipek sütün
- 8- Traş bıçağı
- 9- Serum fizyolojik

- 10- Luteolin (Cayman Chemical, Ann Arbor, Amerika Birleşik Devletleri)
- 11- Ketamin baz (Ketalar®, Pfizer, New York, Amerika Birleşik Devletleri)
- 12- Ksilazin (Rompun® %2, Pfizer)
- 13- Dijital fotoğraf makinası (Canon Powershot S5 IS, Çin)
- 14- Nikon Eclipse E600 ışık mikroskop
- 15- Formol
- 16- Lam, lamel
- 17- Hemotoksilen eozin boyası
- 18- Parafin, ksilen
- 19- Formaldehit
- 20- Etanol



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan preparat; Luteolin (Cayman Chemical, 50mg).

3.3 Yöntem

3.3.1 Çalışma grupları

Hayvanlar randomize olarak her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde öncelikle 2 gruba ayrıldı. Gruplar, kontrol (Grup 1) ve luteolin (Grup 2) olarak adlandırıldı (Tablo 3.1).

Luteolin, iskemi – reperfüzyon hasarının kritik süreci olan ilk 24 saatte etkili olacak biçimde farmakokinetik özellikleri göz önünde bulundurularak operasyon öncesi ve operasyondan 12 saat sonra 10 mg/kg dozunda serum fizyolojik ile sulandırılarak intraperitoneal yolla uygulandı. Birinci gruptaki hayvanlarda da benzer stres oluşturmak amacıyla aynı volümde serum fizyolojik intraperitoneal yolla aynı zamanlarda uygulandı.

Tablo 3.1: Deney Grupları

Grup Adı	Grup Açıklaması	Gruptaki sıçan sayısı (n)
Grup 1	Kontrol	8
Grup 2	Luteolin	8

3.3.2 Cerrahi Teknik

Deney başlamadan önce 15 dakika önce deney grubundaki sıçanlara 10mg/kg intraperitoneal yolla, kontrol grubundaki sıçanlara da aynı hacimde serum fizyolojik aynı stresi oluşturmak üzere intraperitoneal yolla uygulandı. Daha sonra sıçanlara intraperitoneal yolla verilen 10mg/kg ksilazin + 80 mg/kg ketamin ile anestezi sağlandı. Her sıçanın sırt bölgesi ameliyat öncesi traş edilerek povidone iodine ile preoperatif hazırlık yapıldı (Şekil 3.2) Sıçan prone pozisyonda tespit edildi ve tüm cerrahi işlemler asepsi, antisepsi kurallarına uygun olarak aynı cerrah tarafından gerçekleştirildi.

Sıçan dorsumunda her iki skapula ve posterior iliak çıkıntılar işaretlendi. 3x10 cm'lik kaudal tabanlı dorsal yarımada flebi planlandı (Şekil 3.3). Flep kenarları deri altındaki pannikulus karnosus kası flebe dahil edilerek derin kas fasiyası üzerine kadar kesildi. Deri ve altındaki pannikulus karnosus kasından oluşan flep, kas üzerindeki gevşek ve nispeten avasküler anatomik planda ilerlenerek kaldırıldı (Şekil 3.4). Flepler tekrar yerlerine aynı cerrahi travmayı oluşturmak amacıyla önceden planlandığı üzere her 1 cm'ye bir sütür gelecek biçimde 3/0 keskin iğneli atravmatik cerrahi ipek sütürler ile adapte edildi. (Şekil 3.4). Sıçanlar cerrahi işlem tamamlandıktan sonra ayrı kafeslerde yeterli miktarda standart yem ve su ile beslenip, takip edildi.

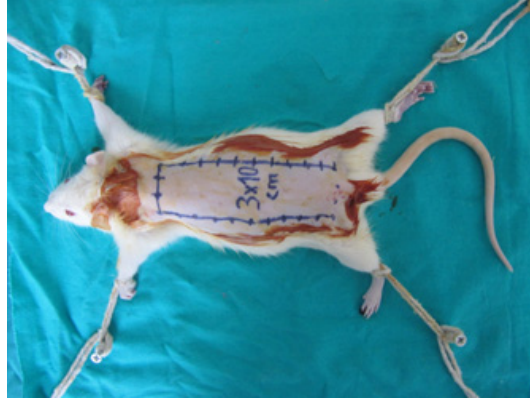
Postoperatif 12. saatte deney grubuna luteolin, kontrol grubuna serum fizyolojik intraperitoneal yolla 2. doz olarak uygulandı.

Postoperatif 1. günde sıçanlardan biyokimyasal inceleme amacıyla kısa süreli anestezi altında flebin en distalinden örnekler alındı ve steril tüplere aktarıldı (29) (Şekil 3.5). Daha sonra oluşan defektler primer olarak onarıldı. 7. günde sıçanlar yukarıdaki anestezi protokolüne uygun bir şekilde tekrar uyutuldu, öncelikle flep nekroz oranını planimetrik olarak hesaplamak amacıyla flep boyutunda milimetrik kağıt yerleştirilerek kontrol ve deney grubunun nekroz paterni ayrı ayrı milimetrik kağıt üzerine aktarıldı (Şekil 3.6). Daha sonra histopatolojik inceleme amacıyla fleplerin sağlam ve nekroz içeren geçiş zonundan 2x1 cm'lik tam kat doku örnekleri alındı (Şekil 3.7).

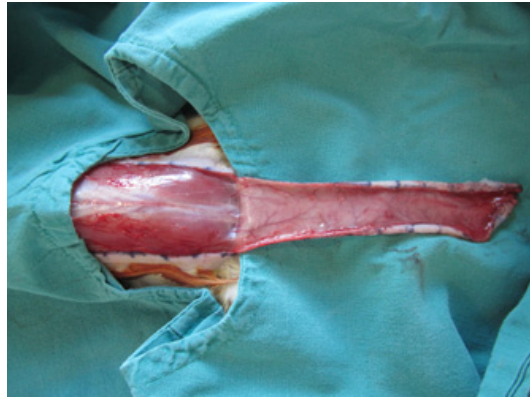
Deney protokolü sona erince sıçanlar yüksek doz anestezik madde uygulanarak sakrifiye edildiler.



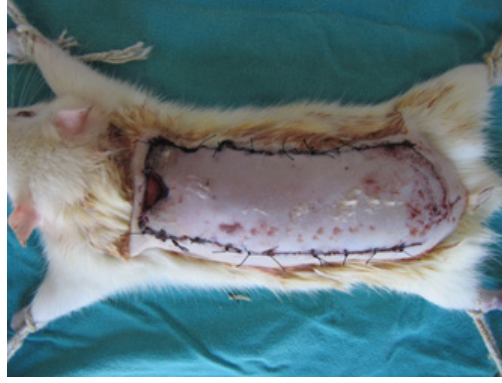
Şekil 3.2: Sıçan dorsumunun planlama öncesi hazırlanması



Şekil 3.3: Sıçan dorsumunda 3x10 cm'lik kaudal tabanlı flebin planlanması



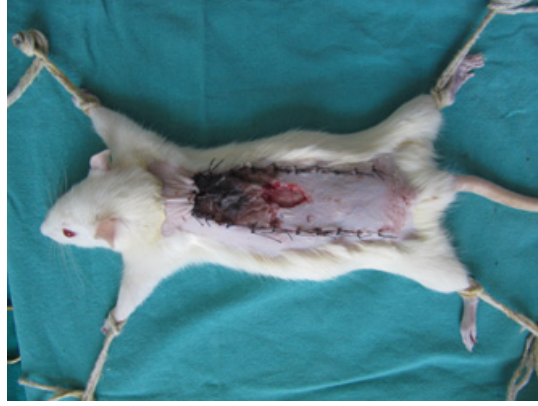
Şekil 3.4: Flebin kaldırılması



Şekil 3.5: Fleplerden biyokimyasal inceleme için doku örneği alınması ve tüplere aktarımı



Şekil 3.6: Operasyon sonrası 7. günde flepte nekroz oranlarının planimetrik olarak hesaplanması



Şekil 3.7: Operasyon sonrası 7. günde flepten histopatolojik inceleme için örnek alınması

3.4 Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1 Biyokimyasal İnceleme

Alınan doku örnekleri -80°C sıcaklıkta derin dondurucuda saklandıktan sonra çalışma gününde dondurucudan alınarak ağırlıklarının 10 katı hacimde (% 10 w/v) serum fizyolojik içinde homojenize edildi. Doku homojenatları $4000 \times G$ 'de 20 dakika süreyle santrifüj edildikten sonra elde edilen süpernatantların protein konsantrasyonlarının belirlenmesinde Lowry'nin protein ölçüm yöntemi kullanıldı. Bu yöntem fosfotungstik asit ve fosfomolibdik asitin, Cu^{+2} -protein kompleksi ile proteinlerin triptofan ve tirozin içeren rezidüleri tarafından, molibden mavisi ve tungsten mavisi oluşturması prensibine dayanmaktadır. Oluşan kompleksin absorbansı 700 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmektedir. Sonuçlar "mg/ml homojenat" olarak belirlendi (30).

3.4.1.1 Malondialdehit seviyesinin belirlenmesi:

Dahle'nin spektrofotometrik yönteminin temeli MDA ile tiyobarbitürik asitin (TBA) oluşturduğu pembe renkli kompleksin 532 nm dalga boyunda verdiği absorbansın ölçülmesine dayanmaktadır. Sonuçlar standart solüsyonla (tetraetoksipropan (TEP)) yapılan ölçümlerden hazırlanan standart grafiğe göre "nmol/mg protein (mg/ml)" cinsinden belirlendi (31).

3.4.1.2 Katalaz aktivitesinin belirlenmesi:

Aebi yöntemine göre, deney ortamına ilave edilen hidrojen peroksit, katalaz tarafından su ve oksijene parçalanmakta, bu sıradaki absorban azalması 240 nm’de ölçülerek enzim aktivitesi belirlenmektedir. Sonuçlar “IU/mg protein (mg/ml)” olarak belirlendi (32).

3.4.1.3 Nitrik oksit seviyesinin belirlenmesi:

Griess reaksiyonu ve modifiye kadmiyum reaksiyonu ile nitrik oksitin asidik ortamda sırasıyla sülfanilik asit ve naftilendiamin çözeltisi ile reaksiyona girmesiyle oluşan rengin 540 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Sonuçlar, “µM/ml homojenat” cinsinden tanımlandı (33).

3.4.1.4 Ksantin oksidaz aktivitesinin belirlenmesi:

Bu yöntemin ilkesi ksantinden ürik asit oluşumunun 293 nm dalga boyunda spektrofotometrik olarak ölçülmesidir. Sonuçlar “mIU/mg protein (mg/ml)” olarak belirlendi (34).

3.4.2 Flep Nekroz Alanı

Cerrahi işlemlerden sonraki 7. günde nekroz alanları ve tüm flep alanları planimetrik olarak ölçüldü. İyileşme sırasında oluşan kontraksiyonun hatalara yol açmasını önlemek amacıyla ilk ölçümler yerine nekroze alanın tüm flep alanına oranı kullanıldı. Yapılan ilk ölçümlerden hesaplanan flep nekroz oranları her iki gruptaki sıçanlar için tek tek yüzdeler olarak ifade edildi (Şekil 3.6)

3.4.3 Histopatolojik Değerlendirme

Kontrol ve deney gruplarında 7. günde flebin nekroz – sağlam doku sınırından uzunluğu 2 cm eni ise 1 cm olacak şekilde doku örnekleri alındı ve %10'luk tamponlu formalin (pH: 7,35) çözeltisine alınarak tespit edildi. Örnekler sırasıyla dereceli alkollerden (%75, %75, %96, %96 (1 gece bekletildi), %100, %100) geçirilerek dehidratasyona uğratıldı. Ksilende şeffaflamaları tamamlanan dokular 60°C etüvde 5 saat sıvı parafin infiltrasyonuna maruz bırakıldı. Sonrasında parafine gömülerek sert bloklar elde edilen dokular +4 °C'de bekletildi. Kesim işlemine başlamadan önce -18°C'ye alınan bloklardan Leica RM 2125RT model mikrotom ile doku örneğinin uzun eksenine paralel olacak ve tüm deri katlarını içerecek şekilde 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilin Eozin (H-E) histolojik boyası ile boyandı ve Nikon Eclipse E600 marka ışık mikroskopuyla incelenerek fotoğraflandı.

Doku örneklerinde iltahabi hücre infiltrasyonu, papiller ve retiküler dermiste ödem, fibrozis, nekroz olmak üzere 4 parametre incelendi (35). Örnekler değerlendirilirken Tablo 3.2'deki skorlama sistemi kullanıldı.

Tablo 3.2: Histolojik değerlendirmeler yapılırken kullanılan skorlama sistemi

	Yok	Az	Orta	Yoğun	Çok Yoğun
PMNL ve lenfosit yoğunluğu	0	1+	2+	3+	4+
Papiller dermiste ödem	0	1+	2+	3+	4+
Fibrozis	0	1+	2+	3+	4+
Nekroz	0	1+	2+	3+	4+

3.4.4 İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin istatistiksel değerlendirmesi SPSS for Windows 15.0 paket programında yapıldı. Veriler ortalama +/- standart sapma ve ortanca (minimum - maksimum) biçiminde özetlendi. Luteolin ve kontrol gruplarının biyokimyasal parametreleri, histopatolojik parametreleri ve flep nekroz yüzdelerinin karşılaştırılmasında Mann Whitney U testi kullanıldı. İstatistiksel anlamlılık sınırı 0,05 ($P<0.05$) olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

4.1 Biyokimyasal Parametreler

Deneyde luteolin ve kontrol gruplarında katalaz, malondialdehid, nitrik oksit ve ksantin oksidaz düzeyleri karşılaştırılmıştır.

Luteolin grubunda iskemi – reperfüzyon hasarının temel başlangıç hücresi olan nötrofillerin ürettiği katalaz enzim seviyesi kontrol grubuyla karşılaştırıldığında luteolin grubu değerlerinde belirgin yükseklik saptanmış ve istatistiksel olarak değerlendirmede katalaz seviyeleri luteolin grubunda kontrol grubuna göre anlamlı ölçüde yüksek bulunmuştur (Tablo 4.1) ($p=0,015$). Diğer yandan, iskemi reperfüzyon hasarında dokuda biriken temel madde olan malondialdehid seviyeleri luteolin grubunda kontrol grubuyla karşılaştırıldığında belirgin düşük olarak saptanmış ve kontrol grubuyla karşılaştırıldığında luteolin grubundaki değerler istatistiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulunmuştur (Tablo 4.2) ($p=0,005$).

Luteolin grubunda ksantin oksidaz seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında luteolin grubunda ksantin oksidaz seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmış ancak luteolin grubuyla kontrol grubunun istatistiksel olarak değerlendirilmesinde anlamlı bir farklılık saptanamamıştır (Tablo 4.3) ($p>0,05$). Diğer yandan luteolin grubunda yine nitrik oksit seviyeleri kontrol grubuyla karşılaştırıldığında luteolin grubunda kontrol grubuna göre nitrik oksit seviyelerinin daha yüksek olduğu saptanmış ancak luteolin grubuyla kontrol grubunun istatistiksel olarak değerlendirilmesinde anlamlı bir farklılık saptanamamıştır (Tablo 4.4) ($p>0,05$).

Tablo 4.1: Luteolin ve kontrol gruplarında katalaz enzimi düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	Katalaz seviyeleri (1. Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	65,38 (36,96 – 83,86) 6,64	0,015
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	39,80 (12,79 – 61,12) 5,09	0,015

Tablo 4.2: Luteolin ve kontrol gruplarında malondialdehid düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	Malondialdehid seviyeleri (1. Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	3,525 (2,35 – 5,48) 0,29	0,005
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	6,97 (3,13 – 15,74) 1,33	0,005

Tablo 4.3: Luteolin ve kontrol gruplarında ksantin oksidaz düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	Ksantin oksidaz seviyeleri (1. Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	0,089 (0,08 – 0,11) 0,01	0,17
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	0,078 (0,01 – 0,11) 0,01	0,17

Tablo 4.4 : Luteolin ve kontrol gruplarında nitrik oksit düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

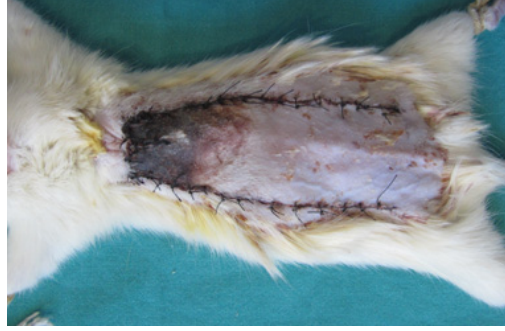
	Nitrik oksit seviyeleri (1. Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	41,75 (29,5 – 90,5) 7,55	0,79
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	37 (33 – 52,5) 2,67	0,79

4.2 Flep Nekroz Alanı Bulguları

Bütün fleplerde postoperatif 7. günde kontraksiyon geliştiği gözlemlendi. Planimetrik ölçümlerle saptanan yüzde oranları luteolin ve kontrol grupları arasında karşılaştırıldı ve luteolin grubunda kontrol grubuna göre flep nekrozları istatistiksel olarak anlamlı oranda daha düşük bulundu (Tablo 4.5) ($p=0,015$)



Şekil 4.1: Kontrol grubunda postoperatif 7. günde görülen nekroz alanı



Şekil 4.2: Luteolin grubunda postoperatif 7. günde görülen nekroz alanı

Tablo 4.5: Postoperatif 7. günde luteolin ve kontrol gruplarında flep nekroz oranlarının istatistiksel olarak karşılaştırılması (Mann Whitney U)

	Flep nekroz oranları (7.Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	37,55 (22 – 49) 3,64	0,015
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	49,7 (43 – 54) 1,69	0,015

4.3 Histopatolojik Bulgular

Luteolin grubu ile kontrol grubunda ödem, inflamatuvar hücre, nekroz ve fibrozis varlığı hematoksilen – eozin boyamasında kesitlerde ayrı ayrı değerlendirilerek skorlandı (Tablo 4.6, 4.7). Tüm verilerin istatistiksel değerlendirmesinde her iki grup arasında tüm parametrelerde istatistiksel olarak anlamlı fark saptandı (Tablo 4.8, 4.9, 4.10, 4.11). Ödem, luteolin grubunda deney grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olarak daha az, PMNL ve lenfosit yoğunluğu luteolin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha az, nekroz luteolin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha az, fibrozis ise luteolin grubunda kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı oranda daha fazla bulundu.

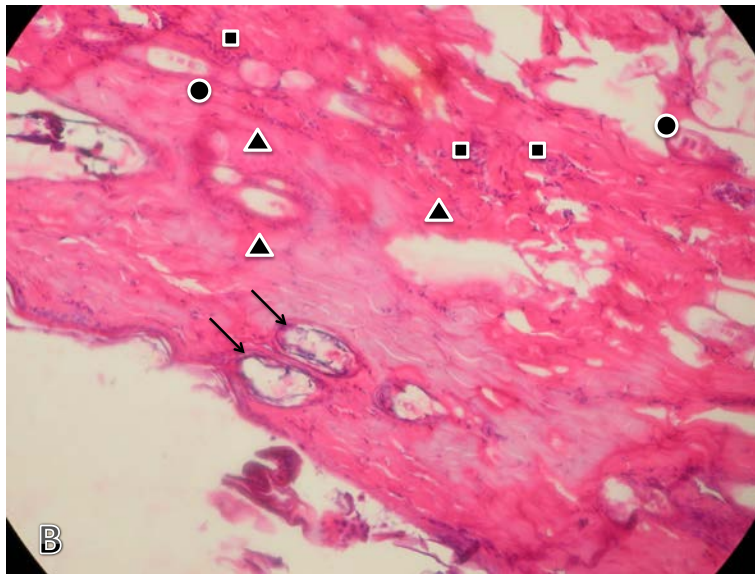
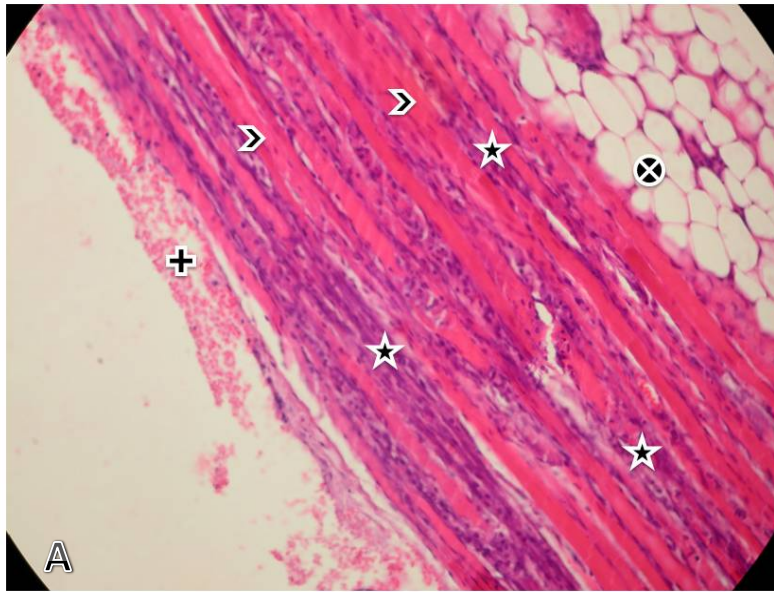
Tablo 4.6: Kontrol grubunda dermiste ödem, PMNL - lenfosit infiltrasyonu, nekroz ve fibrozis parametrelerinin skorlanması

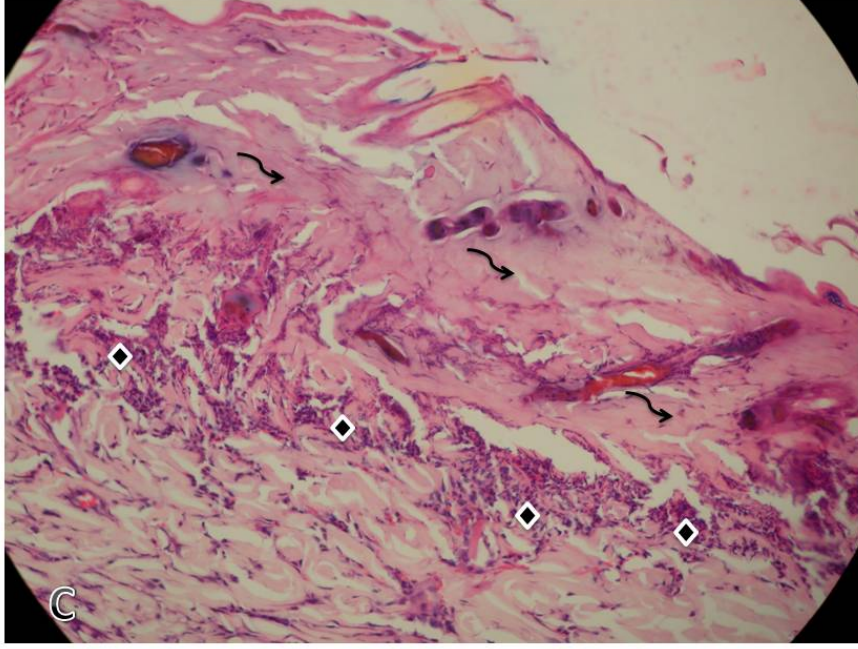
	K-1	K-2	K-3	K-4	K-5	K-6	K-7	K-8
Ödem	+++	++++	++	++++	++	++++	+++	++
PMNL – Lenfosit	+++	+++	+++	++++	+++	+++	+++	+++
Nekroz	+++	++	+++	++	+++	+++	+++	+++
Fibrozis	+	++	+	+	+	++	+	+

Tablo 4.7: Luteolin grubunda dermiste ödem, PMNL - lenfosit infiltrasyonu, nekroz ve ,fibrozis parametrelerinin skorlanması

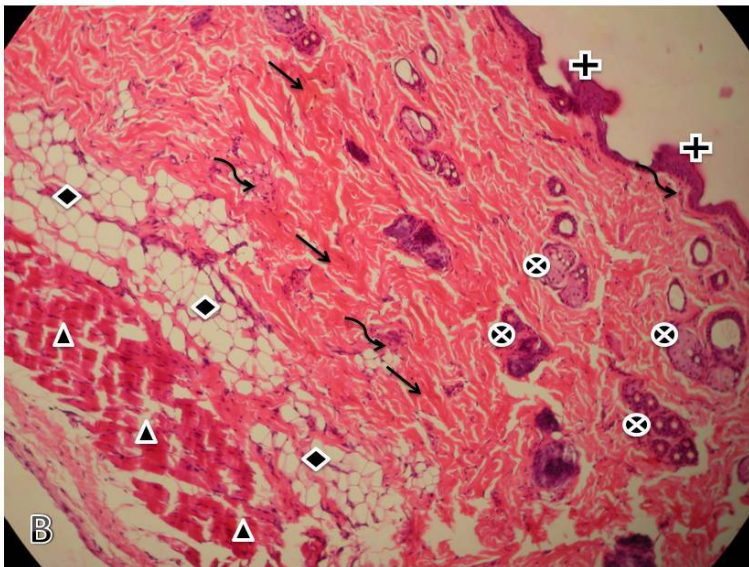
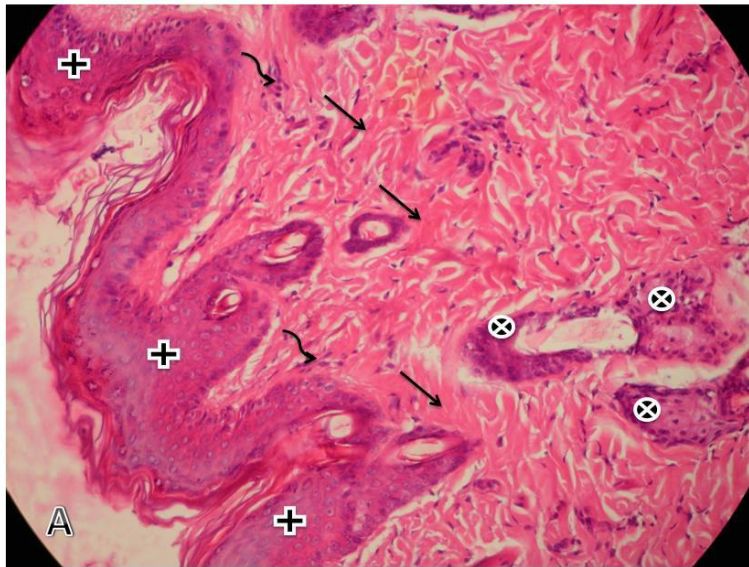
	D-1	D-2	D-3	D-4	D-5	D-6	D-7	D-8
Ödem	++	+	+	+	++	++	+	+
PMNL – Lenfosit	++	+	+	++	+	++	++	+
Nekroz	++	++	++	++	+	+	+	+
Fibrozis	+++	+++	+++	+++	++++	+++	++++	+++

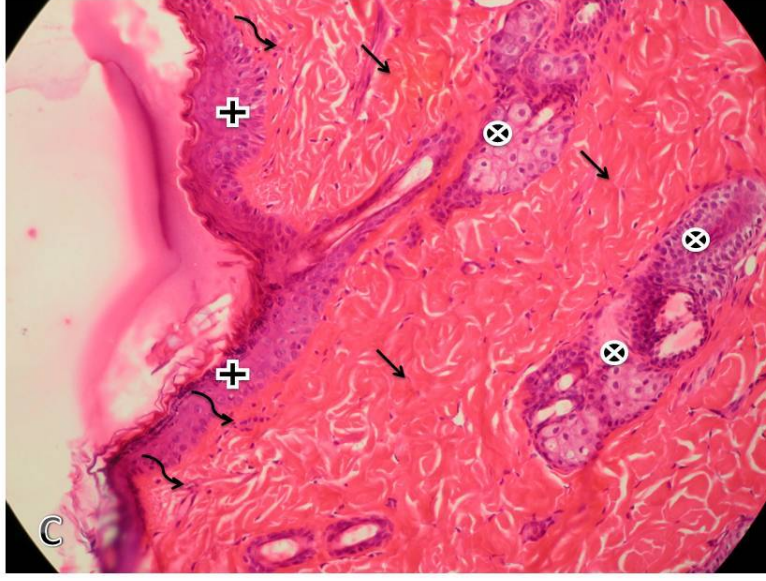
Kontrol grubundaki kesitlerde genel olarak hem kas hem de dermiste ileri derecede infiltrasyon, ödem, nekroz varlığı saptandı (Şekil 4.3). Luteolin grubundaki kesitlerde ise genel olarak inflamatuvar hücre yoğunluğu, ödem ve nekroz az, fibrozis ise belirgin olarak artmış olarak gözlemlendi. Luteolin grubunda fibrozis dışında histopatolojik olarak tamamen normal kesitlerle karşılaşıldı (Şekil 4.4).





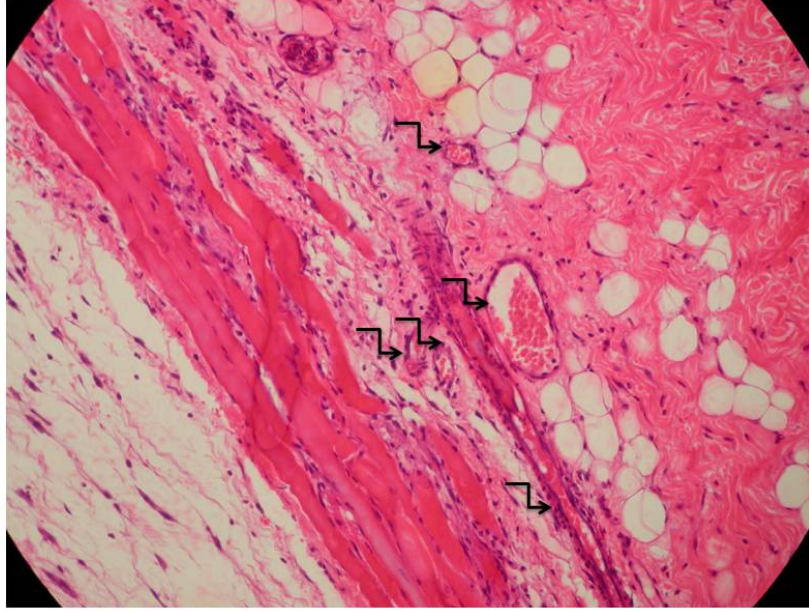
Şekil 4.3: Kontrol gruplarına ait kesitlerde görünüm. **A:** Kontrol 3 nolu sıçan kesitlerinde kas ve dermiste yoğun infiltrasyon ve ödem görülmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme, artı: eritrositler, yıldız: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, köşeli ayraç: kas hücreleri, çarpı: yağ hücreleri.) **B:** Kontrol 3 nolu sıçandan alınan bir diğer kesitte ödem varlığı daha belirgin bir şekilde göze çarpmaktadır. (Boya: H-E, x20 büyütme, daire: kıl folikülleri, dikdörtgen: inflamatuvar hücre infiltrasyonu, ok: kan damarı, üçgen: ödem.) **C:** Kontrol 5 nolu sıçandan alınan kesitte belirgin inflamatuvar hücre infiltrasyonu ve nekroz oluşumu görülmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme, karo: inflamatuvar hücreler, eğri ok: nekroz odakları.)





Şekil 4.4: Luteolin gruplarına ait kesitlerde görünüm. **A:** Deneş 1 nolu sıçan kesitlerinde epitelin sağlamlığı, inflamatuvar hücre infiltrasyonunun oldukça az ve fibrozis varlığı görölmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme) **B:** Deneş 6 nolu sıçandan alınan kesitte tamamen normal doku özelliklerinin korunduğu görölmektedir. Fibrozis varlığı dikkati çekmektedir. (Boya: H-E, x10 büyütme,) **C:** Deneş 8 nolu sıçandan alınan kesitte belirgin fibrozis, epitelde bütünlük ve nekrozun olmaması dikkati çekmektedir. (Boya: H-E, x20 büyütme) (artı: epitel, eğri ok: inflamatuvar hücreler, çarpı: deri ekleri, üçgen: kas dokusu, elmas: yağ dokusu, düş ok: fibrozis)

Bunun dışında, luteolin grubunda bazı kesitlerde ek olarak artmış vaskülarizasyona ait görüntüleri rastlandı (Şekil 4.5)



Şekil 4.5: Deney 4 nolu sıçandan alınan kesitte normale yakın doku özelliklerinin yanı sıra yeni damar oluşumları dikkati çekiyor. (Boya: H-E, x20 büyütme, köşeli ok: yeni damar oluşumları)

Sonuç olarak, luteolin grubunda iskemi – reperfüzyon hasarının temel göstergelerinden olan inflamatuvar hücre infiltrasyonu önemli ölçüde azalmış olarak gözlemlendi. Yine iskemi – reperfüzyon hasarında doku hasarı parametreleri olan ödem, nekroz bulguları luteolin grubunda oldukça azalmış olarak gözlemlendi. Fibrozis ise luteolin grubunda artmış olarak gözlemlendi.

Tablo 4.8: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik ödem düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	Ödem (7.Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	1 (1 – 2) 0,18	0,003
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	3 (2 – 4) 0,33	0,003

Tablo 4.9: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik inflamatuvar hücre düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	PMNL ve Lenfosit (7.Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	1,5 (1 – 2) 0,19	0,0004
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	3 (3 – 4) 0,12	0,0004

Tablo 4.10: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik nekroz düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	Nekroz (7.Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	1,5 (1 – 2) 0,19	0,0021
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	3 (2 – 3) 0,16	0,0021

Tablo 4.11: Luteolin ve kontrol gruplarında histopatolojik fibrozis düzeyleri ve istatistiksel veriler (Mann Whitney U)

	Fibrozis (7.Gün)	P
Luteolin Grubu (n=8) Ortanca (min-maks) Standart sapma	3 (3 - 4) 0,33	<0,001
Kontrol Grubu (n=8) Ortanca(min-maks) Standart sapma	1 (1 – 2) 0,16	<0,001

5. TARTIŞMA

Plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahinin temel özelliği çeşitli nedenlerle oluşmuş doku eksikliklerinde veya dokuların birtakım etkilere bağlı oluşan deformasyonları sonucunda etkilenen bölgelerde tekrar form ve fonksiyon kazandırmaktır. Bu nedenler arasında travma, tümör eksizyonu sonrası, enfeksiyonlar veya metabolik nedenler sayılabilir. Özellikle vücutta oluşan tam kat deri kayıplarında primer onarım yapılamadığında deri fleplerinin kullanılması başlıca kullanılan yöntemlerden biridir. Vücudun birçok alanında kanlanma paterninden dolayı tüm deri fleplerini aksiyel paternli oluşturabilmek mümkün olmamaktadır, çoğunlukla random paternli kanlanması olan deri fleplerinden yararlanılmaktadır. Random paternli deri fleplerinde beslenme yüzeysel pleksus vasıtasıyla olmaktadır ve 2:1 boy:en oranına sadık kalınacak biçimde flepler kaldırılabilen, bu oran 2:1'in üzerine çıktığında flep distalinde oluşacak kritik iske mi ve sonrasında reperfüzyon hasarı ile doku hasarının daha da yaygınlaşması sonucu doku ölümü, flep distalinde nekroz kaçınılmaz hale gelmektedir. Nekroz oluşunca ek cerrahi girişimler, hastanede kalış süresinde artış, artan tedavi masrafları gibi istenmeyen sonuçlar meydana gelmektedir. Bu bağlamda random paternli fleplerin distal kısmında gelişen iske mi – reperfüzyon hasarını azaltarak flebin yaşayabilir kısmını arttırmak klinik olarak önemli bir hedefdir (36,37).

Flep cerrahisinde oluşan nekrozların sebepleri intrinsek ya da ekstrinsek olmak üzere iki grupta toplanabilir. Yetersiz kan akımı ana intrinsek faktör olarak kabul edilmekte ve en sık flep kaybına neden olan sebep olarak göze çarpmaktadır (38). Ekstresek nedenler ise sistemik, çevresel ve teknik olarak üç grupta toplanabilir, sistemik nedenler arasında hipotansiyon, arteriyopati ve enfeksiyon, çevresel nedenler arasında sıcaklık, kompresyon ve gerginlik, teknik nedenler arasında ise planlama ve uygulama hatalarını sayabiliriz (38). Tüm bu nedenler flep kaybına neden olabilmektedir. Flebin elevasyonu ile birlikte flebin distalinde inkomplet bir iske mi, yani yetersiz bir kan akımı olmaktadır. İske mik dokuda ise önce ATP düzeyleri azalmakta, sonrasında anaerobik metabolizmaya geçilmekte ve laktik asit birikimi olmaktadır. Bir yandan laktik asit birikimi doku pH'ını

azaltırken, bir yandan da hücre membranı bütünlüğünü sağlayan Na:K ATP'az pompası çalışmaz duruma gelir ve bunun sonucunda da hücre içi kalsiyum ve sodyum değerleri artar. Dokuların iskemiye olan toleransı boyutunda süreç uzadığında doku nekrozu kaçınılmaz hale gelmektedir (7). Bu durumda reperfüzyonun en kısa zamanda gerçekleşmesi iskemik doku nekrozunun sınırlanması için temel gereklilik haline gelmektedir. Paradoksal olarak, uzamış iskemi süresinde dokuda biriken metabolitlerin de etkisiyle, reperfüzyon gerçekleşince temel olarak mitokondrilerin ürettikleri reaktif oksijen metabolitleri vasıtasıyla doku hasarı daha da artabilmektedir (7). Hatta reperfüzyonun iskemiye göre daha çok doku hasarına sebep olduğu öne sürülmektedir (39).

Yukarıda da belirtildiği gibi bir random paternli deri flebi kaldırıldığında flebin distalinde başlangıçta kan akımı ciddi biçimde azalmaktadır ancak 24 saat sonra ciddi bir şekilde tekrar artmaktadır (40). Başlangıçtaki flep distalindeki iskemi, inkomplet bir iskemi özelliğindedir (41). Hücresel düzeyde ise, bu inkomplet iskemi sırasında nötrofillerin aktivasyonuna bağlı olarak inflamatuvar yanıt ve ödem gelişimi, endotel disfonksiyonu, trombosit aktivasyonu ve sonucunda lümen içi trombüs oluşumu da hasardan sorumlu temel etkenlerdir (42,43). Komplet iskemi ile total doku hasarının oluştuğu düşünülürse, inkomplet iskemik alanda iskemik hasarın azaltılması ve reperfüzyon hasarına girilmeden normal reperfüzyon fazına girilerek doku sağkalımının artırılması oldukça önemli bir hedefdir. Bu doğrultuda, iskemik doku hasarı sonrası gelişen reperfüzyon hasarında ilk 24 saatte dokuların iskemiye olan toleransını arttırmanın flep sağkalımını önemli ölçüde olumlu etkileyeceği düşünülerek bu yönde farklı mekanizmalar üzerinden etkili olabilecek maddelerle ve yöntemlerle birçok çalışma yürütülmüştür.

Yöntemler arasında cerrahi veya farmakolojik geciktirme yöntemleri sayılabilir. Farmakolojik ajanlar arasında vazodilatörler, Na:K ATP'az inhibitörü, fosfodiesteraz inhibitörleri, neovaskülarizasyon yapan ajanlar, büyüme faktörleri, prostaglandin inhibitörleri, kalsiyum kanal blokörleri, antikoagülanlar ve serbest radikalleri ortadan kaldıran antioksidanlar farmakolojik ajanlar başlığı altında sayılabilir (44-54). Yine yöntem olarak, yağ hücresi kökenli kök hücre, elektroşok dalgası, lazer ve trombosit zengin plazmanın deri fleplerindeki etkileri üzerine yapılmış çalışmalar da mevcuttur (55-58).

Flavinoidler birçok bitki tarafından üretilen difenilpropan yapısı içeren maddelerdir. Flavinoidler birçok hastalığın önlenmesi ve tedavisinde etkili olduğunu gösteren prelinik ve klinik çalışmalar mevcuttur (15). Antioksidan özellikleri içeriklerindeki iki yapıdan kaynaklanmaktadır: B – halkalı katekol grubu ve C4'ün okso grubuyla etkileşen C2 ve C3 çift bağı (15). Bunlardan birincisi serbest radikallere hidrojen/elektron donörü olarak, ikincisi ise metal iyonlara yani geçiş metallere bir bağlanma noktası olarak işlev görür (59,60). Flavinoidler antioksidan etkilerinin araştırıldığı de Martino ve ark. yaptığı çalışmada luteolin > quercetin> catechol> morin> rutin sıralamasında antioksidan aktivite tanımlanmıştır (61). Bir başka çalışmada da literatürde iyi bir şekilde tanımlanmış olan quercetin ile karşılaştırıldığında luteolin'in antioksidan aktivitesinin prooksidan aktivitesine göre oldukça yüksek olduğu ve güvenilirlik profilinin daha iyi olduğu gösterilmiştir (62). Flavinoidler genel olarak proinflamatuvar sitokinlerin yapımını belli aşamalarda inhibe ederek etki göstermektedir, diğer yandan içerisinde luteolin'in de olduğu bir grup gen düzeyinde de etkinliğe sahiptir (63). Luteolin'in antiinflamatuvar etkinliği için birçok mekanizma üzerinden etkili olduğu da ayrıca gösterilmiştir (62).

Tüm bu bilinen etkilerinden yola çıkılarak flavinoidler hakkında birçok çalışma yapılmıştır. Woo Cheon ve ark. yaptığı çalışmada epigallocatechin maddesinin random paternli deri flebindeki etkilerini topikal uygulama, lokal enjeksiyon, salin enjeksiyonu, topikal aseton-zeytinyağı ve tedavisiz olmak üzere 5 grupta incelemişler ve sonuç olarak hem topikal hem lokal enjeksiyon grubunda flebin sağkalan alanının yüksek, Doppler ölçümlerde kan akımının yüksek ve kapiller dansite/VEGF ekspresyonunun yüksek olduğu sonucuna varmışlardır (64).

Kim ve arkadaşları kalp kası hücre kültüründe iskemi – reperfüzyon hasarına bağlı endoplazmik retikulum stresi ve hücre ölümünü çeşitli flavinoidlerle engellemeyi amaçladıkları çalışmada biokanin A, daidzein, genistein, luteolin, quercetin ve rutin uygulamışlar ve tüm flavinoidler bcl-2 anti-apoptotik gen ekspresyonunu artırdığını, bax proapoptotik geninin ekspresyonunu azalttığını göstermişler ve endoplazmik retikulum stres proteinlerinin ekspresyon seviyelerini azalttıklarını göstermişlerdir. Sonuç olarak flavinoidler iskemi – reperfüzyon hasarının etkilerini azalttığını ve hücre koruyucu olduğunu göstermişlerdir (65).

Shimoi ve ark. yaptığı çalışmada luteolin ve luteolin 7-O- β ' nin ratlarda ve insanlarda oral uygulaması sonrası plazmada esas olarak serbest luteolin ve konjuge formlarının bulunduğunu ve ratlarda konjuge formlarının 12 saate kadar saptanabildiğini göstermişlerdir (66). Chen ve ark.'nın ratlarda luteolin ve tetraasetil luteolin'in oral uygulamasını takiben farmakokinetik özelliklerini araştırdıkları bir diğer çalışmada oral tek doz uygulamayı (30 mg/kg) takiben her iki maddenin de iki kompartımanlı dağılıma uyduklarını ve luteolin'in plazmada yaklaşık olarak 10 saate kadar varlığını sürdürdüğünü göstermişlerdir (67). Literatür tarandığında deney hayvanları üzerinde luteolin ile yapılan çalışmalarda genellikle oral uygulama yolunun kullanılmış olduğu ancak intraperitoneal uygulamanın da yapıldığı çalışmaların mevcut olduğu görüldü (68,69). Bu çalışmalarda ratlarda intraperitoneal olarak genellikle 10 mg/kg veya rat başına 4,3 mg (insanda 1000 mg doza karşılık) tek doz uygulama yapılmıştır. Oral uygulamada ise 10 veya 50 mg/kg'dan 5 veya 10 mg/kg'a kadar farklı dozlarda uygulamalar yapılmıştır (70,71).

Diyetle alınan vitaminler ve mineraller ile akut miyokard enfarktüsü ve serebrovasküler olay arasındaki ilişki üzerine yapılan popülasyona yönelik çalışmada luteolin'in akut miyokard enfarktüsü ve serebrovasküler olay riskini ileri yaş popülasyonda ciddi ölçüde azalttığı gözlenmiştir ($p=0,0096$) (72). Bu çalışmada da olduğu gibi luteolin'in insanlar üzerinde kullanımını çoğunlukla luteolin'den zengin gıdalar yoluyla olmaktadır. Luteolin'i saf formda içeren "Lutimax" isimli ticari preparat FDA onayını almamakla birlikte otizm tedavisinde yardımcı olarak kullanılmakta ve bu preparatta saf luteolin'in biyoyararlanımı esas olarak karbonhidrat metabolizmasını düzenleyen rutin adlı bileşikle artırılmıştır. Aynı zamanda, "Neuroprotek" isimli ticari preparatta luteolin, quercetin ve rutin isimli flavinoidlerle zeytin çekirdeği yağı ile lipozomal formülasyon şeklinde oluşturulan kombinasyonla kullanıldığında diğer tedavilere dirençli olan otizm tedavisinde 4 ay süreyle kullanım sonrası otizm bulgularında gerileme saptayan bir çalışma da mevcuttur. Bu çalışmada formülasyonun iyi tolere edildiği ve herhangi bir yan etkiyle karşılaşmadığı ortaya atılmıştır (75). Luteolin'in saf olarak insanlarda kullanıma girmesi için daha geniş kapsamlı deneysel ve sonrasında klinik deneylerin yapılması gerektiği aşikardır.

Çeşitli çalışmalar luteolin'in doku üzerindeki koruyucu etkilerini göstermektedir. Fang ve ark. primer kültüre edilmiş hipokampal nöronlar üzerinde 2 saatlik oksijensiz ve glukozsuz ortam sonrası 24 saatlik reperfüzyon fazı sonrası değerlendirmede oksijensiz ve glukozsuz fazda luteolin alan grupta almayan gruba göre belirgin oranda nöronal sağkalımın arttığını, apoptozisin azaldığını ve bu bulguların doz bağımlı olduğunu ortaya atmışlardır.. Yine aynı çalışmada 10 dakikalık global iskemi veya oksijensiz glukozsuz ortam sonrası 24 saatlik reperfüzyon fazı sonrası luteolin alan grupta almayan gruba göre belirgin oranda Na:K ATP'az pompa aktivitesinin korunduğunu öne sürmüşlerdir (73).

Liao ve ark. tarafından luteolin'in ratlarda miyokardiyal iskemi–reperfüzyon hasarı üzerine etkilerinin araştırıldığı çalışmada koroner oklüzyondan 15 dakika önce intravenöz yolla uygulanan luteolin sonrası ventriküler taşikardi ve ventriküler fibrilasyona bağlı mortalitenin hem iskemi hem de reperfüzyon fazında anlamlı derecede azaldığını, plazma laktat dehidrogenaz, nitrik oksit ve malondialdehid seviyelerinin yine anlamlı derecede azaldığını, buna bağlı olarak enfarkt alanının küçüldüğünü göstermişlerdir. İndüklenebilir nitrik oksit proteininin ve mRNA' sının baskılandığını ancak endotelial ve nöronal nitrik oksit sentaz aktivitesinin etkilenmediğini ortaya atmışlardır (74).

Qiao ve ark. yürüttüğü çalışmada ratlarda deneysel iskemik serebrovasküler olay modelinde orta serebral arter oklüzyonunun hemen sonrası intraperitoneal 10 ve 25 mg /kg dozlarda uygulanan luteolin'in nöroprotektif ve antioksidan etkilerini araştırmışlar ve luteolin'in SOD-1, KAT, bcl-2 ve claudin-5 aktivitesini anlamlı oranda arttırdığını, MDA ve Bax seviyelerini anlamlı oranda azalttığını göstermişlerdir. Buna bağlı olarak luteolin'in beyin su içeriğini, infarkt büyüklüğünü ve nörolojik defisitleri anlamlı oranda azalttığını bulmuşlardır (76).

Wang ve ark. luteolin'in rat karaciğerinde oluşturulan iskemi – reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırdığı çalışmada oral olarak işlem öncesinde 4 hafta süreyle 200 mg/kg luteolin eklenmiş yemle luteolin uygulaması sonrası luteolin grubunda model grubuna göre AST ve ALT seviyelerinin anlamlı oranda düşük, SOD seviyelerinin anlamlı oranda yüksek ve MDA seviyelerinin anlamlı oranda düşük olduğunu bulmuşlardır. Aynı zamanda sitoplazmik vakualizasyon ve şişme

gibi yapısal değişikliklerin de yine luteolin ile anlamlı oranda azalmış olduğunu göstermişlerdir (25).

Yukarıdaki paragraflarda belirtildiği gibi kalp, karaciğer, sinir dokularında iskemi – reperfüzyon hasarı üzerine olumlu etkileri olan ve antioksidan, antiinflamatuvar, antiapopitotik etkileri çeşitli çalışmalarda gösterilmiş olan flavinoid yapısındaki luteolin'in flep cerrahisi üzerinde olumlu sonuçlar doğuracağı dūřünülererek çalışma planlandı.

Luteolin ile ilgili yayınlara bakıldığında yukarıda da belirtildiği gibi birden fazla (25, 70) veya tek doz (68, 69, 74, 76) halinde uygulama yapılan çalışmalar mevcut olup luteolin'in etkisinin iskemi – reperfüzyon hasarının kritik aşaması olan ilk 24 saatte etkili olması dūřünülererek iki doz ve intraperitoneal yolla uygulama yapılması planlandı.

Çalışmada, Wistar albino cinsi erkek sıçanlarda, 3x10 cm uzunluğundaki kraniyal tabanlı, random paternli dorsal yarımada fleplerinde flep yaşayabilirliğini artıracaağı dūřünülen flavinoid yapılı luteolin'in 2 doz intraperitoneal uygulaması sonrası flep sağkalım oranı üzerine ve iskemi – reperfüzyon hasarı parametreleri üzerine etkileri araştırıldı.

Flavinoid ailesinde antioksidan etkinliğinin oldukça gūlü olduğu ve bunun yanında birçok yoldan antiinflamatuvar, antiapopitotik etkinliği de yukarıda bahsedilen çalışmalarda gösterilmiş olan luteolin'in bu özelliklerinden yola çıkılarak kalp, karaciğer, beyin gibi dokularda iskemi – reperfüzyon hasarında koruyucu etkinliği yine yukarıda bahsedilen çalışmalarda gösterilmiş olup, bu çalışmada da yukarıda sayılan araştırmalarla benzerlik gösterecek şekilde, luteolin'in flep yaşayabilirliği üzerine olumlu katkı sağlayacağı dūřünülmekle birlikte biyokimyasal verilerde ksantin oksidaz seviyeleri ve nitrik oksit seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı olmayan neticelerin elde edilmesi, Qiao ve ark.'nın luteolin'in deneysel iskemik inme modelindeki etkilerini araştırdığı çalışmada luteolin'i 10 mg/kg ve 25 mg/kg olarak dūřük ve yūksək doz uygulamasıyla iki farklı tedavi grubu olarak karşılaştırdıkları çalışmada antioksidan, antiapopitotik etkilerinin yūksək doz uygulamada daha belirgin ortaya çıkmasından hareketle bu sonucun doz bağımlı olabileceğini göstermektedir.

Diğer yandan, Chen ve ark. yürüttüğü farelerde bleomisin ile oluşturulan deneysel akciğer fibrozisi modelinde luteolin'in tekrarlayan oral uygulama sonrası nötrofil infiltrasyonu ve TNF- α ve IL-6 gibi inflamatuvar sitokinlerin seviyelerinin bu çalışmayı destekler nitelikte baskılandığını bulmasının yanında hem kollajen birikiminin hem de akciğerdeki fibroblastları miyofibroblastlara dönüştüren TGF- β 'nın da baskılandığını bulması bu çalışmanın bulgularının aksini göstermektedir (77). İskemik dokuda erken reperfüzyonda oluşan reaktif oksijen radikallerinin fibrozis oluşumuna ve varolan fibrozisin artmasına neden olduğuna dair bir çalışma daha mevcuttur (78). Domitrovic ve ark. ise benzer olarak farelerde karbondioksit ile oluşturulan karaciğer fibrozisi modelinde luteolin'in matriks metalloproteinaz 9 ve metallothionein seviyelerini arttırarak ekstrasellüler fibrinöz depozitleri azalttığını, karaciğer yapısını histolojik olarak düzelttiğini ve tüm bu etkilerin doz bağımlı (10, 25, ve 50 mg/kg, i.p., 2 hafta süreyle her gün) olduğunu saptamışlardır (79). Bu çalışmada fibrozis düzeylerinin yukarıda bahsedilen çalışmaların tersine anlamlı oranda artmış bulunması antifibrotik etkinin doz bağımlı olarak ortaya çıkabileceğine ya da doku hasar mekanizmalarının farklılığına bağlanabilir. Literatürdeki çalışmalarda toksin kaynaklı doku hasarı ön planda iken, bu çalışmada iskemik hasar ön plandadır. Bu doğrultuda luteolin'in etkisinin kesin olarak gösterilebilmesi için daha geniş kapsamlı ve ileri çalışmalar yapılması uygun olacaktır.

6. SONUÇLAR

Sıçan sırtında oluşturulan random paternli deri flep modelinde luteolin'in flep yaşayabilirliği üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Luteolin verilen grupta biyokimyasal verilerden katalaz ve malondialdehid seviyelerinde, histopatolojik verilerde ve flep nekroz yüzdelerinde istatistiksel olarak anlamlı oranda koruyucu yönde fark bulunmuştur.

2. Kontrol ve luteolin grubu arasında biyokimyasal verilerden ksantin oksidaz ve nitrik oksit seviyelerinde istatistiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Luteolin'in elde edilen bu sonuçlara göre hastanede kalış süresi, maliyetler ve morbiditeye neden olan iskemi – reperfüzyon hasarı ve sonucundaki flep nekrozlarından koruyucu etkileri görülmekle birlikte yapılacak daha geniş çalışmalar bu doğal flavinoid yapılu maddenin etkisi hakkında daha fazla bilgiye ulaşılmasını sağlayacaktır.

ÖZET

Sıçan Sirtında Oluşturulan Dorsal Random Paternli Deri Flebi Modelinde Luteolin' in Flep Yaşayabilirliği ve İskemi – Reperfüzyon Hasarı Üzerine Olan Etkilerinin Araştırılması

Amaç: Luteolin, hidrosile flavinoid yapısında birçok bitkide doğal olarak bulunan bir maddedir. Güçlü antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri mevcuttur. Bu çalışmada luteolin'in sıçan sırtında oluşturulan random paternli deri flep modelinde flep uç kısmında oluşan iskemi – reperfüzyon hasarı üzerine ve flep yaşayabilirliği üzerine olan etkileri araştırılmıştır.

Yöntem: Ratlar her bir grupta 8 hayvan olacak şekilde randomize olarak 2 gruba ayrıldı. Luteolin grubuna cerrahiden 30 dakika önce ve 12 saat sonra 10 mg/kg luteolin intraperitoneal yoldan verildi. Kontrol grubundaki hayvanlarda da benzer stres oluşturmak amacıyla aynı hacimde serum fizyolojik intraperitoneal yolla verildi. Sıçan dorsumundan 3x10 cm'lik kraniyal tabanlı McFarlane flebi planlanıp eleve edildi. Cerrahiyi takiben postoperatif 1. günde biyokimyasal inceleme için flebin distal ucundan örnek alındı. Alınan örneklerde katalaz, malondialdehid, ksantin oksidaz ve nitrik oksit seviyeleri saptandı. Postoperatif 7. günde fleplerde nekroz oranı planimetrik olarak hesaplandı. Daha sonra histopatolojik incelemeler için flebin nekroz – yaşayan alan geçiş zonundan tam kat doku örneği alındı. Deney protokolü sona erince sıçanlar yüksek doz anestezik madde uygulanarak sakrifiye edildiler. Alınan biyopsiler ışık mikroskopu altında hematoksilen – eozin boyasında ödem, PMNL ve lenfosit infiltrasyonu, nekroz ve fibrozis açısından incelenip karşılaştırıldı.

Bulgular: İki grup arasında postoperatif 1. gün biyokimyasal veriler karşılaştırıldığında luteolin grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda katalaz yüksek ($p= 0,015$), malondialdehid düşük ($p= 0,005$), anlamlı olmayacak düzeyde ksantin oksidaz ve nitrik oksit seviyeleri yüksek bulundu. Postoperatif 7. günde geçiş zonundan alınan örneklerin histopatolojik incelemesinde luteolin grubunda istatistiksel olarak anlamlı oranda ödem ($p=0,003$), inflamatuvar hücre ($p=0,0004$) ve nekroz az ($p=0,0021$), fibrozis fazla ($p<0,001$) bulundu. Flep nekroz alanı oranları karşılaştırıldığında istatistiksel olarak anlamlı oranda luteolin grubunda daha az nekroz gözlemlendi. ($p=0,015$)

Sonuç: Luteolin'in iskemi – reperfüzyon hasarı ve flep yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkileri görülmüştür. Ancak yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar bu maddenin etkileri hakkında daha fazla bilgiye ulaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: İskemi – reperfüzyon, flep yaşayabilirliği, flep cerrahisi, luteolin, sıçan

SUMMARY

Study of the Effects of Luteolin on Ischaemia – Reperfusion Injury and Flap Viability in Random Pattern Dorsal Skin Flaps

Aim: Luteolin is a naturally hydroxylated flavone derivative and founded in many plants naturally. It has strong antioxidant, antiinflammatory and antiapoptosis properties. In this study, the effects of luteolin on ischaemia – reperfusion injury and flap viability is evaluated in random pattern dorsal rat skin flap.

Methods: Rats were divided into 2 groups with 8 rats in each one within randomised pattern. 10 mg/kg dose luteolin dissolved in saline and administered intraperitoneally to each rat 30 min before surgery and 12 hours after surgery. In order to create the similar stress on the rats of the control group, same amount of saline given intraperitoneally. A cranial based McFarlane flap with 3x10 cm was planned on rat dorsum and elevated. For the biochemical analysis, samples were taken from the distal part of skin flap on the first day after surgery. Catalase, malondialdehyde, xanthine oxidase, nitric oxide levels determined in tissue samples. On the postoperative day 7, flap survival rate calculated with planimetric method. After then, tissue samples were taken for histochemical analysis from the survival – necrosis transition zone of each flap and animals were sacrificed with high dose anesthetic drugs. Biopsies were examined under light microscopy and compared groups for the oedema, inflammatory cell infiltration, necrosis and fibrosis.

Results: The statistical analysis of biochemical levels showed that there is a significant higher catalase levels ($p=0,015$) and significant lower malondialdehyde levels ($p=0,005$) in luteolin group and there have been no statistical differences between two groups on xanthine oxidase and nitric oxide levels. According to histopathologic examination, in luteolin group, oedema ($p=0,003$), inflammatory cell infiltration ($p=0,0004$) and necrosis founded statistically significant lower than control group ($p=0,0021$) and fibrosis founded statistically higher than control group. ($p<0,001$) The survival rate of flaps was statistically higher in luteolin group. ($p=0,015$)

Conclusion: Luteolin had beneficial effect on ischaemia – reperfusion injury and flap survival in dorsal random pattern skin flaps. However, further studies with luteolin will help us to get more information about the effect and solving the bioavailability problems of luteolin.

Keywords: Ischaemia – reperfusion, flap viability, flap surgery, luteolin, rat.

KAYNAKLAR

1. Mc Gregor IA, Morgan G. Axial and random pattern flaps. Br J Plast Surg 26:(3), 202-213, 1973.
2. Taylor GI, Palmer JH. The vascular territories (angiosomes) of the body: Experimental study and clinical applications. Br J Plast Surg 40:(2), 113-141, 1987.
3. Nakajima H, Fujino T, Adachi S. A new concept of vascular supply to the skin and classification of skin flaps according to their vascularisation. Ann Plast Surg 16:(1), 1-19, 1986.
4. Taylor GI, Caddy CM, Watterson PA, et al. The venous territories (venosomes) of the human body: Experimental study and clinical implications. Plast Reconstr Surg 86:(2), 185-213, 1990.
5. Daniel RK, Kerrigan CL. Skin flaps: An anatomical and hemodynamic approach. Clin Plast Surg. 1979 Apr;6 (2):181-200
6. Daniel RK. and Kerrigan CL, Principles and physiology of skin flap surgery. JG McCarthy, Editor, Plastic Surgery, WB Saunders, Philadelphia (1990), pp. 275–328.
7. Wang WZ, Baynosa RC, Zamboni WA. Update on ischemia-reperfusion injury for the plastic surgeon: 2011. Plast Reconstr Surg. 2011 Dec;128 (6):685e-92e.
8. Nielsen F, Mikkelsen BB, Nielsen JB, Andersen HR, Grandjean P. Plasma malondialdehyde as biomarker for oxidative stress: reference interval and effects of life-style factors. Clin Chem 1997;43:1209-14
9. Vedder N. B., 2006. Flap Physiology. Mathes Plastic Surgery, 2nd ed., volume 1, Saunders Elsevier, Philadelphia, 483-506 p.
10. Bayramıçlı M. Deneysel Mikrocerrahi. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ., 2005. Bölüm 1.5, sayfa 85
11. Palmer B., G. Jurell, and 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 (1): p. 6-12

12. Myers MB ve Cherry G. Augmentation of survival in pedicle skin flaps by the chemical production of ischemia. *Surg Forum.* 22:485-6, 1971.
13. Khouri RK, Angel MF, Edström LE. Standardizing the dorsal rat flap. *Surg Forum.* 37:590-4, 1986.
14. Khouri RK, Edström LE, Angel MF. The dorsal rat flap: an appraisal of the model. *Surg Forum.* 37:598-9, 1986.
15. Miguel LN. Distribution and biological activities of luteolin. *Med Chemistry* 9:(1), 31-59, 2009.
16. Ziyang L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med.* 2007 Mar;73 (3):221-6
17. Kim JS, Jobin C. The flavonoid luteolin prevents lipopolysaccharide-induced NF-kappaB signalling and gene expression by blocking IkappaB kinase activity in intestinal epithelial cells and bone-marrow derived dendritic cells. *Immunology.* 2005 Jul;115 (3):375-87.
18. Rice-Evans CA.; Miller N.J.; Paganga, G. Structure anti-oxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Rad. Biol. Med.*, 1996,20,933-56
19. Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.;Florencio, M.H.;Jennings,K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a mechanism for their antioxidant activity. *Free Rad. Res.*, 2002, 36,1199-208
20. Hu, C., Kitts, D.D. Luteolin and Luteolin – 7-O-glucoside from dandelion flower suppress iNOS and COX-2 in RAW264.7 cells. *Mol. Cell Biochem.*, 2004, 265, 107-113
21. Choi, B. M.; Lim, D.W.; Lee,J.A.; Gao, S.S.; Kwon, D.Y.; Kim, B.R. Luteolin suppresses Cisplatin-induced apoptosis in auditory cells: possible mediation through induction of heme oxygenase-1 expression. *J. Med. Food.*, 2008,11,230-6
22. Pei-Hu Liao, PhD; Li-Man Hung, PhD; Yi-Hung Chen, PhD; Yu-Hsiang Kuan, PhD;Friedrich Bo-Yuan Zhang, MD; Ruey-Hseng Lin, MD; Hung-Che Shih, PhD;Shen-Kou Tsai, MD, PhD; Shiang-Suo Huang, PhD.

- Cardioprotective Effects of Luteolin During Ischemia – Reperfusion Injury in Rats. *Circ J* 2011;75:443-450
23. Fang Fang, Dongye Li, Huanjun Pan, Dan Chen, Lingling Qi, Ruiqu Zhang, Hong Sun. Luteolin Inhibits Apoptosis and Improves Cardiomyocyte Contractile Function through the PI3K/Akt Pathway in Simulated Ischemia/Reperfusion *Pharmacology* 2011;88:149-158
 24. Zhu LH, Bi W, Qi RB, Wang HD, Lu DX. Luteolin inhibits microglial inflammation and improves neuron survival against inflammation. *Int J Neurosci.* 2011 Jun;121 (6):329-36.
 25. Wang GG, Lu XH, Ding M, Tang WT, Li W, Zhao X, Zhang C. Protective effects of luteolin preconditioning on rat liver under ischemia/reperfusion. *Sheng Li Xue Bao.* 2011 Apr 25;63 (2):177-83
 26. Xiujie Chen, Lei Liu, Zhizhong Sun, Yongsheng Liu, Jiankai Xu, Sibao Liu, Bangqing Huang, Ling Ma, Zhiguo Yu, Kaishun Bi. Pharmacokinetics of luteolin and tetra-acetyl-luteolin assayed by HPLC in rats after oral administration. *Biomed. Chromatogr.* 2010; 24: 826–832
 27. Kayoko Shimoi, Hisae Okada, Michiyo Furugori, Toshinao Goda, Sachiko Takase, Masayuki Suzuki, Yukihiro Hara, Hiroyo Yamamoto, Naohide Kinae. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-L-glucoside in rats and humans. *FEBS Letters* 438 (1998) 220-224
 28. Tsai FS, Peng WH, Wang WH, Wu CR, Hsieh CC, Lin YT, Feng IC, Hsieh MT. Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life Sci.* 2007 Apr 10;80 (18):1692-8
 29. Jun Gyu Moon, Hong Chul Lim, Myeoung Ryoung Gye, Joon Seo Oh, Jong Woong Park. Postconditioning Attenuates Ischaemia-Reperfusion Injury In Rat Skin Flap. *Microsurgery* 28:531–537, 2008
 30. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1951;193:265-75.
 31. Dahle LK, Hill EG, Hollman RT (1962) The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arc Biochem Biophys* 98: 253-261.

32. Aebi H. Catalase. In: Bergmeyer HU (ed) *Methods of Enzymatic Analysis*. New York: Academic Press 1974;673-684
33. Ridnour LA, Sim JE, Hayward MA, Wink DA, Martin SM, Buettner GR, Spitz DR (2000) A spectrophotometric method for the direct detection and quantitation of nitric oxide, nitrite, and nitrate in cell culture media. *Anal Biochem* 281:223–229.
34. Corrocher R, Carasil M, Bellisola G. Severe impairment of antioxidant system in human hepatoma. *Cancer* 1986;58:1658–62.
35. Karaaslan O, Ulusoy MG, Kankaya Y, Tiftikcioglu YO, Kocer U, Kankaya D, Karaaslan GM, Tuncer S, Berktas M. Protective effect of grape seed extract against ischaemia – reperfusion injury in a rat epigastric flap model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2010 Apr;63 (4):705-10.
36. Pang Y, Lineaweaver WC, Lei MP, Oswald T, Shamburger S, Cai Z, Zhang F. Evaluation of the mechanism of vascular endothelial growth factor improvement of ischemic flap survival in rats. *Plast Reconstr Surg* 2003;112:556–564.
37. Foster BC, Arnason JT, Briggs CJ. Natural Health Products and Drug Disposition. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2005;45:203-226.
38. De Lima Silva JJ, Guimaraes SB, da Silveira ER, de Vasconcelos PR, Lima GG, Torres SM, de Vasconcelos RC. Effects of *Copaifera langsdorffii* Desf. on ischaemia – reperfusion of randomized skin flaps in rats. *Aesthetic Plast Surg*. 2009 Jan;33 (1):104-9.
39. Loerakker S, Oomens CW, Manders E, et al. Ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle assessed with T (2)-weighted and dynamic contrast-enhanced MRI. *Magn Reson Med*. 2011;66:528–537.
40. Suzuki S, Miyachi Y, Niwa Y, et al. Significance of reactive oxygen species in distal flap necrosis and its salvage with liposomal SOD. *Br J Plast Surg* 1989;42:559e64.
41. Akamatsu J, Ueda K, Tajima S, et al. Sulfatide elongates dorsal skin flap survival in rats. *J Surg Res* 2000;92:36e41.

42. Aydogan H, Gurlek A, Parlakpinar H, Askar I, Bay-Karabulut A, Aydogan N, Fariz A, Acet A. Beneficial effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on the ischaemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *J Plast Reconstr Aesth Surg* (2007) 60, 563e568
43. 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.
44. Gümüő N, Odemiő Y, Yılmaz S, Tuncer E. Effect of topically applied minoxidil on the survival of rat dorsal skin flap. *Aesthetic Plast Surg*. 2012 Dec;36 (6):1382-6
45. Emami H, Talab SS, Nezami BG, Elmi A, Assa S, Ostovaneh MR, Dehpour AR. Na (+)-H (+) exchange inhibition attenuates ischemic injury in rat random pattern skin flap: The role of mitochondrial ATP-sensitive potassium channels. *Eur J Pharmacol*. 2012 Nov 2 doi:pii: S0014-2999 (12)00868-0
46. Brewer MB, Stump AL, Holton LH, Janes LE, Silverman RP, Singh DP. Effects of systemic tadalafil on skin flap survival in rats. *Eplasty*. 2012;12:e45.
47. Park HJ, Lee S, Kang KH, Heo CY, Kim JH, Yang HS, Kim BS. Enhanced random skin flap survival by sustained delivery of fibroblast growth factor 2 in rats. *ANZ J Surg*. 2012 Sep 3. doi: 10.1111/j.1445-2197.2012.06194.x
48. Vourtsis SA, Spyriounis PK, Agrogiannis G, Papalois A, Ionac M Does VEGF have an effect on the survival of a long random skin flap by its application at the recipient area? *Chirurgia (Bucur)*. 2012 Jul-Aug;107 (4):494-500.
49. Barral SM, Araujo ID, Vidigal PV, Mayrink CA, Araujo AD, Costa PR. Effects of sildenafil on the viability of random skin flaps. *Acta Cir Bras*. 2011 Aug;26 (4):314-9
50. Shafighi M, Olariu R, Fathi AR, Djafarzadeh S, Jakob SM, Banic A, Constantinescu MA. Dimethyloxalylglycine stabilizes HIF-1 α in cultured human endothelial cells and increases random-pattern skin flap survival in vivo. *Plast Reconstr Surg*. 2011 Aug;128 (2):415-22

51. Freitas FA, Piccinato CE, Cherri J, Marchesan WG. Effects of pentoxifylline and heparin on reperfusion injury island skin flaps in rats exposed to tobacco. *J Surg Res.* 2010 Nov;164 (1):139-45
52. Rinker B, Fink BF, Barry NG, Fife JA, Milan ME. The effect of calcium channel blockers on smoking-induced skin flap necrosis. *Plast Reconstr Surg.* 2010 Mar;125 (3):866-71
53. Kwon ST, Jeong JH, Eun SC, Baek RM, Minn KW, Heo CY. 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
54. Gideroglu K, Yilmaz F, Aksoy F, Bugdayci G, Saglam I, Yimaz F. Montelukast protects axial pattern rat skin flaps against ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2009 Dec;157 (2):181-6
55. Reichenberger MA, Germann G, Roth HJ, Meirer R, Engel H. Preoperative shock wave therapy reduces ischemic necrosis in an epigastric skin flap model. *Ann Plast Surg.* 2009 Dec;63 (6):682-4
56. Cury V, Bossini PS, Fangel R, Crusca Jde S, Renno AC, Parizotto NA. The effects of 660 nm and 780 nm laser irradiation on viability of random skin flap in rats. *Photomed Laser Surg.* 2009 Oct;27 (5):721-4
57. Reichenberger MA, Heimer S, Schaefer A, Lass U, Gebhard MM, Germann G, Leimer U, Köllensperger E, Mueller W. Adipose derived stem cells protect skin flaps against ischemia-reperfusion injury. *Stem Cell Rev.* 2012 Sep;8 (3):854-62
58. Li W, Enomoto M, Ukegawa M, Hirai T, Sotome S, Wakabayashi Y, Shinomiya K, Okawa A. Subcutaneous injections of platelet-rich plasma into skin flaps modulate proangiogenic gene expression and improve survival rates. *Plast Reconstr Surg.* 2012 Apr;129 (4):858-66.
59. Rice-Evans, C.A.; Miller, N.J.; Paganga, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic. Biol. Med.*, 1996, 20, 933-56.
60. Mira, L.; Fernandez, M.T.; Santos, M.; Rocha, R.; Florencio, M.H.; Jennings, K.R. Interactions of flavonoids with iron and copper ions: a

- mechanism for their antioxidant activity. *Free Radic. Res.*, 2002,36, 1199-208.
61. De Martino L, Mencherini T, Mancini E, Aquino RP, De Almeida LF, De Feo V. In vitro phytotoxicity and antioxidant activity of selected flavonoids. *Int J Mol Sci.* 2012;13 (5):5406-19
 62. Seelinger, G.; Merfort, I.; Schempp, C.M. Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-allergic activities of luteolin. *Planta Med.* 2008, 74, 1667–1677.
 63. Kim HP, Son KH, Chang HW, Kang SS. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *J Pharmacol Sci.* 2004 Nov;96 (3):229-45
 64. Cheon YW, Tark KC, Kim YW. Better survival of random pattern skin flaps through the use of epigallocatechin gallate. *Dermatol Surg.* 2012 Nov;38 (11):1835-42
 65. Kim DS, Kwon DY, Kim MS, Kim MK, Lee YC, Park SJ, Yoo WH, Chae SW, Chung MJ, Kim HR, Chae HJ. The involvement of endoplasmic reticulum stress in flavonoid – induced protection on cardiac cell death caused by ischaemia/reperfusion. *J Pharm Pharmacol.* 2010 Feb;62 (2):197-204.
 66. Shimoi K, Okada H, Furugori M, Goda T, Takase S, Suzuki M, Hara Y, Yamamoto H, Kinae N. Intestinal absorption of luteolin and luteolin 7-O-beta-glucoside in rats and humans. *FEBS Lett.* 1998 Nov 6;438 (3):220-4
 67. Chen X, Liu L, Sun Z, Liu Y, Xu J, Liu S, Huang B, Ma L, Yu Z, Bi K. Pharmacokinetics of luteolin and tetra-acetyl-luteolin assayed by HPLC in rats after oral administration. *Biomed Chromatogr.* 2010 Aug;24 (8):826-32
 68. Tsai FS, Peng WH, Wang WH, Wu CR, Hsieh CC, Lin YT, Feng IC, Hsieh MT. Effects of luteolin on learning acquisition in rats: involvement of the central cholinergic system. *Life Sci.* 2007 Apr 10;80 (18):1692-8.
 69. Papaliodis D, Boucher W, Kempuraj D, Theoharides TC. The flavonoid luteolin inhibits niacin-induced flush. *Br J Pharmacol.* 2008 Apr;153 (7):1382-7
 70. Tsai FS, Cheng HY, Hsieh MT, Wu CR, Lin YC, Peng WH. The ameliorating effects of luteolin on beta-amyloid-induced impairment of water maze performance and passive avoidance in rats. *Am J Chin Med.* 2010;38 (2):279-91.

71. Ziyan L, Yongmei Z, Nan Z, Ning T, Baolin L. Evaluation of the anti-inflammatory activity of luteolin in experimental animal models. *Planta Med.* 2007 Mar;73 (3):221-6.
72. Marniemi J, Alanen E, Impivaara O, Seppänen R, Hakala P, Rajala T, Rönnemaa T. Dietary and serum vitamins and minerals as predictors of myocardial infarction and stroke in elderly subjects. *Nutr Metab Cardiovasc Dis.* 2005 Jun;15(3):188-97.
73. Fang L, Zhang M, Ding Y, Fang Y, Yao C, Zhang X. Protective effects of luteolin on neurons against oxygen-glucose deprivation/reperfusion injury via improving Na⁺/K⁺ -ATPase activity. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi.* 2010 Apr;35 (8):1051-4.
74. Liao PH, Hung LM, Chen YH, Kuan YH, Zhang FB, Lin RH, Shih HC, Tsai SK, Huang SS. Cardioprotective effects of luteolin during ischemia-reperfusion injury in rats. *Circ J.* 2011 Feb;75 (2):443-50.
75. Theoharides TC, Asadi S, Panagiotidou S. A case series of a luteolin formulation (NeuroProtek®) in children with autism spectrum disorders. *Int J Immunopathol Pharmacol.* 2012 Apr-Jun;25 (2):317-23
76. Qiao H, Dong L, Zhang X, Zhu C, Zhang X, Wang L, Liu Z, Chen L, Xing Y, Wang C, Li Y Protective effect of luteolin in experimental ischaemic stroke: upregulated SOD1, CAT, Bcl-2 and claudin-5, down-regulated MDA and Bax expression. *Neurochem Res.* 2012 Sep;37 (9):2014-24.
77. Chen CY, Peng WH, Wu LC, Wu CC, Hsu SL. Luteolin ameliorates experimental lung fibrosis both in vivo and in vitro: implications for therapy of lung fibrosis. *J Agric Food Chem.* 2010 Nov 24;58(22):11653-61.
78. Poli, G., 2000. Pathogenesis of liver fibrosis: role of oxidative stress. *Mol. Aspects Med.* 21, 49–98.
79. Domitrović R, Jakovac H, Tomac J, Sain I. Liver fibrosis in mice induced by carbon tetrachloride and its reversion by luteolin. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2009 Dec 15;241(3):311-21.