

RAT İSKEMİK DERİ FLEPLERİNDE DEFIBROTIDE® (CAS 83712-60-1)'İN DOKU NİTRİK OKSİT VE FLEP YAŞAMINA ETKİSİ

İrfan ÖZYAZGAN, Recep SARAYMEN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı, Biyokimya Anabilim Dalı, Kayseri

ÖZET

Defibrotide® (CAS 83712-60-1), iskemik dokularda, önceki çalışmalarda flep yaşamını artırdığı gösterilen NO düzeyini artırır. Buradan yola çıkarak Defibrotide®'in flep yaşamını artırabileceği hipotezi ile deneysel bir çalışma yapıldı. Bu amaçla 24 rat, Kontrol, Defibrotide100 ve Defibrotide200 olmak üzere üç gruba ayrılarak sırtlarında 3 x 10 cm boyutlarında deri flepleri hazırlandı. Bu sırada fleplere komşu bölgelerden deri örnekleri alındı. Fleplerin oluşturulmasından hemen sonra kontrol grubuna serum fizyolojik, Defibrotide100 grubuna 100 mg/kg/gün Defibrotide®, Defibrotide200 grubuna 200 mg/kg/gün Defibrotide®, gavaj yoluyla, iki doza bölünerek verildi. Cerrahi işlemin üçüncü günü bitiminde fleplerden deri örnekleri alınarak tüm deri örneklerinde total nitrik oksit düzeyleri ölçüldü ve başlangıç değerlerine göre değişimler elde edildi. Kontrol grubunda NO düzeyleri başlangıç düzeylerine kıyasla belirgin olarak arttı. Defibrotide®, bu artış hızını 200 mg/kg dozunda azaltırken, 100 mg/kg dozunda başlangıca kıyasla azalmaya neden oldu. Defibrotide® flep yaşam oranını değiştirmedi.

Anahtar Kelimeler: Nitrik oksit, flep, defibrotide, iskemik

SUMMARY

The Effect of Defibrotide (CAS 83712-60-1) on Tissue Nitric Oxide and Flap Survival of Rat Ischemic Skin Flaps

Defibrotide® (CAS 83712-60-1) enhances nitric oxide content of ischemic tissues, which increased flap survival in other studies. So, an experimental study was performed with the hypothesis that Defibrotide® could enhance survival of flap. For this purpose, caudally based 3 x 10 cm skin flaps were prepared on the dorsal midline of 24 rats which were divided into Control, Defibrotide100, and Defibrotide200 groups and skin samples were obtained from adjacent areas. Immediately after flap elevation, serum physiologic, 100 mg/kg Defibrotide® or 200 mg/kg Defibrotide® were given by gavage divided in two doses to the rats in Control, Defibrotide100 and Defibrotide200 groups respectively. On the third day of flap elevation, the tissue nitric oxide levels increased in control group flaps relative to the initial levels; Defibrotide® decreased the increase rate of nitric oxide at the dose of 200mg/kg while decreasing the nitric oxide levels compared to initial levels at the dose of 100 mg/kg. Defibrotide® did not change the survival rate in either dose.

Key Words: Nitric oxide, flap, defibrotide, ischemia

GİRİŞ

Nitrik oksit (NO) hücre içinde ve dokularda vazodilatasyon, sinir iletimi, enflamasyon ve immünolojik olaylar gibi çeşitli fonksiyonları düzenleyen önemli bir sinyal molekülüdür¹. NO, fizyolojik şartlarda memeli vücudunda faydalı etkilere sahipken, patolojik durumlarda sitotoksik etkiler gösterir.

Cerrahi flepler, plastik cerrahi uygulamaları içinde temel tekniklerden birisidir. Bu flepler arasında yer alan rasgele yapılı pediküllü fleplerin güncel plastik cerrahi uygulamaları içinde geçerlilikleri azalır gibi görünmektedir ve bilimsel dergilerde daha az yer almaktadırlar. Ancak, pediküllü flepler mikrocerrahi

uygulamalarının yapılamayacağı durumlarda son çare olabilmektedirler. Özellikle bu gibi durumlarda fleplerde görülebilecek kayıplar, parsiyel olsa bile, daha az tahammül edilebilir niteliktedir. Bu nedenlerle pediküllü bir flebin yaşamını artırmaya yönelik veya dolaşımı bozulmuş bir flebin kurtarılmasına yönelik girişimler hala güncel olmalıdır. Ayrıca bu çalışmalarla, fleplere benzer durumlar ve iskemik dokularla ilgili genel bilgiler de elde edilebilir.

Flep pedikülündeki kan desteğinin regülasyonu, flep yaşamı için gerekli olan kan akımını sağlamakta önemli bir faktördür. Flep pedikülünde bulunan vasküler endotelial hücreler bir flebin kan akımının ana kontrol

Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından desteklenmiş (#97-011-9) ve 23. Ulusal Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kongresi 2001, İstanbul'da poster olarak sunulmuştur.

elemanlarındandır. Endotelial nitrik oksit sentaz tarafından üretilen NO, flep periferindeki dolaşımın devam ettirilmesinde rol oynar ve L-arginin verilerek NO üretimi artırıldığında deri fleplerinde iskemik nekrozun azaldığı gösterilmiştir². Ayrıca deri fleplerindeki iskeminin endotel hasarına neden olduğu, yapısal nitrik oksit sentaz aktivitesinde azalma ve indüklenebilir nitrik oksit aktivitesinde artış geliştiği gösterilmiştir³.

Defibrotide® (DFT) bir polideoksiribonükleik asit tuzudur. Endotel koruyucu^{4,5}, mikrosirkülasyonu iyileştirici^{6,7}, antitrombotik-trombolitik^{8,9} etkileri vardır. Ayrıca polimorfonükleer lökositleri^{10,11} ve mast hücrelerini¹² azaltıcı etkilerinin yanı sıra, antiinflamatuar¹³ etkileri de tariflenmiştir. Prostaglandin I₂ yapımını artırarak reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisi de gösterilmiştir^{10,14}. DFT'in prostaglandin I₂ artışıyla, azalmış olan NO üretimini dengelediği, koroner damarlardaki hiperaktiviteyi azalttığı¹⁵ ve iskemi-reperfüzyonda koroner kan akımındaki nitrit miktarını artırdığı da bildirilmiştir¹⁶.

İskemik flep dokularında NO'nun artırılmasının flep yaşamını artırması² ve DFT'in iskemik dokularda NO düzeylerini artırması¹⁵ göz önüne alınarak, DFT'in iskemik rasgele yapıları deri fleplerinde NO düzeylerini ve yaşam oranını artırabileceği hipotezini test etmek amacıyla bu çalışma yapılmıştır.

METOD

Deney modeli

Ağırlıkları 345-600g arasında değişen 24 rat, ağırlık ortalamaları açısından gruplar arasında fark olmayacak şekilde, üç gruba ayrıldı. Ketamin anestezisi ile (40 mg/kg, intraperitoneal), sırt kılları kuru tıraş edilen hayvanların sırtlarında kaudal bazlı 3 x 10 cm boyutlarında Mc Farlane deri flepleri planlanarak pannikülüs ile birlikte kaldırıldı¹⁷. Bu sırada flebe komşu sırt derisinden 0,5 x 1 cm boyutlarında deri örnekleri alınarak -80°C'de, derin dondurucuda saklandı. Flep pedikülünde, flebin alt yüzündeki pannikülüs kesilerek flepler rastgele yapıları hale getirildi. Flepler 4/0 ipek ile kontinu olarak yerine yeniden dikildi. Hayvanlar kafeslerde tek olarak takip edildiler ve su ve standart hayvan yemi ile serbest olarak beslendiler.

Deney grupları Fleplerin yapılmasından hemen sonra, gruplardaki hayvanlara gavaj yoluyla günde iki doza bölünerek şu şekilde tedavi verildi: Defibrotide100 grubu: 100mg/kg/gün Defibrotide®, Defibrotide200 grubu: 200mg/kg/gün Defibrotide®, Kontrol grubu: 0,4cc/100g/gün SF.

Deri örnekleme Üçüncü gün sonunda fleplerin iskemik olan ve ön çalışmalarda belirlenen nekroz-canlı alan sınırında olacak şekilde planlanan bölgelerinden, flep kenarından eliptik olarak 0,5 x 1 cm boyutlarında deri örnekleri alınarak -80°C'de derin dondurucuda

saklandı.

Nitrik oksit ölçümü 300-500 mg ağırlığındaki deri örnekleri, 0,32 mol/L, pH: 7,5 olan potasyum fosfat içerisinde, Dunche tipi homojenizatör ile homojenize edilerek Lowry metodu ile protein konsantrasyonu belirlendi (18). Nitrik oksit ölçümlerinden önce örnekler deproteinize edildi. Bu işlem için, kısaca, 200 ml homojenat, 400 ml 0,5 N sodyum hidroksit ve 400 ml %10 çinko sülfat karıştırıldı; karışım vortekslenildi ve 4°C'de 25000 g'de 5 dakika santrifüj edildi.

NO ölçümü, metabolitleri olan nitrat ve nitritler üzerinden yapıldı. Önce nitratlar nitrite indirildi. Bu işlem, örneklere 0,05 ünite/ml nitrat redüktaz (Sigma), 200mmol/L indirgenmiş nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (b-NADPH) ve 10mmol/L flavin adenin dinükleotid (FAD) eklenerek gerçekleştirildi. Nitrit oluşumu spektrofotometrik Griess reaksiyonu ile belirlendi. Bu işlem için de kısaca, 250 ml deproteinize örnek, 7,5 ml, 0,32 mol/L, pH: 7,5 olan potasyum fosfat, 2,5 ml FAD, 25 ml b-NADPH ve 15 ml nitrat redüktaz karıştırıldı. Karışım 10 dakika inkübe edildi. Total nitrit ölçümü için, % 5 lik fosforik asit içinde % 2 lik p-aminobenzonesülfonamid ve % 0,2 N-(1naphtyl) etilendiamin dihidrokloridinden eşit hacimlerde eklenerek hazırlanan Griess reaktifinden 1 hacim eklenerek yapıldı. Absorbans, 540 nm de, standart sodyum nitrat eğrisi ile karşılaştırılarak ölçüldü (19,20). İşlem içi ve işlemler arası varyasyonlar sırası ile % 1,8 ve 2,7 idi. Nitrik oksit değerleri miligram protein başına mikromol olarak elde edildi.

Bütün deri örneklerinin biyokimyasal ölçümleri tamamlandıktan sonra, her bir hayvana ait başlangıç NO değerlerinden işlem sonrası üçüncü güne ait değerler çıkarıldı. Fark, başlangıç değerine bölünüp 100 ile çarpılarak NO seviyelerindeki, başlangıca kıyasla olan yüzdelik değişimler elde edildi.

Flep canlılık ölçümü Yedinci gün sonunda fleplerin canlı ve nekrotik bölge sınırları tamamen belirdikten sonra, anestezisi altında, flep sınırları ve nekrotik bölge sınırları şeffaf çizilip asetata ve tarayıcı aracılığı ile bilgisayara aktarılarak, bir bilgisayar programı ile yaşam oranı belirlendi.

İstatistik Gruplar arasındaki ortalamaların farklılıklarını test etmek için parametrik olmayan Mann Whitney U testi kullanıldı. p değerinin 0,05'e eşit veya küçük olduğu durumlar istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

SONUÇLAR

Yedinci gün sonunda tüm fleplerde nekrotik bölge belirgin şekilde sınırlandı ve uygun şekilde ölçümler yapılabilirdi. DFT kullanılan her iki grupta da kontrol grubuna kıyasla flep yaşamında farklılık gözlenmedi. Median flep yaşam oranları Defibrotide100 grubunda

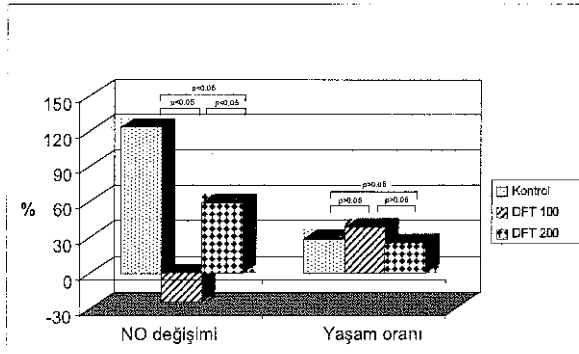
% 37,6, Defibrotide200 grubunda % 24,6 ve kontrol grubunda % 28,4 olarak belirlendi.

Kontrol grubunda flep oluşturulduktan sonraki total nitrik oksit düzeyleri, başlangıç değerlerine kıyasla % 123 oranında arttı. Bu değişiklik Defibrotide100 grubunda % 24 oranında azalma iken Defibrotide200 grubunda % 58 oranında artış şeklinde gerçekleşti. Gruplar arasında, flebin iskemik bölgesinde başlangıç değerlerine göre olan NO düzeyindeki değişiklik açısından istatistiksel olarak fark vardı ($p<0,03$)(Tablo 1)(Grafik 1).

Tablo 1: Gruplardaki meydan yaşam oranı, NO değerleri ve değişim oranları

Gruplar	Ağırlık (g)	A		B	(B-A)/A
		Flep yaşam oranı (%)	Başlangıç NO düzeyi ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	İskemik flep bölgesinde NO düzeyi ($\mu\text{mol}/\text{mg}$ protein)	Başlangıç düzeyine kıyasla NO değişim oranı
Kontrol	437 (345-580)	28.4 (14.3-42.3)	0.0675 (0.022-0.106)	0.163 (0.087-0.234)	1.2349* (0.55-3.56)
Defibrotide 100	535 (450-600)	37.6 (21.5-43.7)	0.1675 (0.111-0.248)	0.127 (0.75-0.197)	-0.2418* (-0.61-0.38)
Defibrotide 200	490 (450-550)	24.6 (16.8-34.7)	0.0875 (0.056-0.187)	0.095 (0.080-0.192)	0.5823* (-0.57-1.27)

* $p<0.03$, NO: nitrik oksit



Grafik 1: Gruplarda bazal değerlere oranla NO'in % olarak değişimi ve flep yaşam oranları

TARTIŞMA

Flep nekrozu, rekonstrüktif cerrahide hala tamamıyla çözülememiş bir problemdir. Özellikle rasgele yapıli fleplerde yaşam oranını artırmaya yönelik bir ilaç arama çalışmaları herkesçe kabul edilen ve klinikte uygulanabilen bir ajan bulmayı başaramamıştır. Flep yaşamını artıran ve iskemik nekrozu kısıtlayan birçok çalışmada sempatotikler²¹, vazodilatör ajanlar^{22,23}, kalsiyum kanal blokörleri²⁴, eikozanoidler^{25,28} veya bunların sentez inhibitörleri^{28,32}, steroidler³³, hemorolojik ilaçlar^{34,35}, yüksek enerji substratları³⁶, hiperbarik oksijen ve hiperbarik hava³⁷, değişik elektrik uyarıları³⁸, serbest oksijen radikal gidericileri^{39,41} ve NO öncülleri^{22,42} kullanılmıştır. Fleplerin iskemik

dönemde uğradığı değişikliklerinin hepsinin tamamıyla anlaşılammış olmasının, adı geçen yöntemlerin kabul edilmelerine rağmen kullanılmamakta olmalarına katkısı vardır. Ayrıca doku seviyesindeki hormonal veya moleküler değişikliklerin tek değil çok sonuçlu olabilmelerinin de bu olayda rolü bulunabilir.

NO de farklı şartlarda dokuda değişik sonuçlar doğurabilen bir maddedir. NO, L-arginin'den nitrik oksit sentaz etkisiyle üretilir⁴⁵. NO sentazın iki izoformu vardır: 1- Yapısal NO endotel ve nöronlarda bulunur ve hücre içi kalsiyum düzeyinin artışıyla aktive olur. 2- İndüklenebilir NO sentaz makrofajlarda bulunur ve nötrofil ve makrofajların sitokinler veya mikrobik ürünlerle aktivasyonuna cevapta ortaya çıkar^{1,44}. NO fizyolojik şartlarda yapısal NO sentaz tarafında yapılır ve damar düz kası üzerinde etkili olarak kan basıncını düzenlediği gibi^{1,45} platelet agregasyon ve adhezyonunu da önler^{46,47}.

NO'in damarlar ve plateletler üzerindeki etkileri göz önüne alındığında ortamda bulunması, flep yaşamı için faydalı olur görünmektedir. Bununla uyumlu olarak Um ve ark. da flep periferindeki perfüzyonun devam ettirilmesinde endotelial yapısal NO sentazın ürettiği NO'in rol oynadığını ve NO öncüsü olan L-arginin verilmesinin flep nekrozunu azalttığını göstermiştir². Cordeiro ve ark. da L-arginin vererek flep yaşamını artırmışlar ve PNL sayısında azalma gözleyerek, L-arginin verilerek oluşan NO'in lökosit birikimini engellediğini ve iskemik reperfüzyon hasarının önlendiğini ileri sürmüşlerdir⁴⁸. Ayrıca son çalışmada N-nitro-L-arginin metilester (L-NAME) verilerek NO sentezinin önlenmesi, L-arginin'in faydalı etkisini antagonize etmiştir. Aynı araştırma ekibi, bir NO öncüsü olan L-arginin'in, domuzlarda kas-deri fleplerinde iskemi-reperfüzyon hasarını azalttığını ve böylece flep yaşamını artırdığını, L-arginin'in bu faydalı etkisinin bir NO sentaz blokörü olan L-NAME verilerek antagonize edildiğini göstermişlerdir⁴². Bu çalışmada NO düzeyleri ile NO sentaz alt gruplarının kantitatif değerlendirmeleri yapılmamıştır. Oshima ve ark.larının çalışmalarında da tavşan epigastrik ada flebinin drene eden vende NO düzeyleri artmış, NO sentaz inhibitörü L-NAME verilmesi bu artışı baskılamıştır⁴⁹. Bu son çalışmada flep yaşamı değerlendirilmemiştir. Gribbe ve ark. ise, bir indüklenebilir NO sentaz inhibitörü olan Dekametazon'un, hem NO sentaz aktivitesini, hem de flep nekrozunu azalttığını göstermişlerdir⁵⁰.

Yukarıda anılan çalışmaların hepsinde L-NAME ile NO sentezinin azaltılması flep yaşamını olumsuz olarak etkilerken, NO'in varlığı flep yaşamını pozitif yönde

etkilemiştir. Fakat, Guo ve ark.⁵¹ ile Knox ve ark. larının^{52,53} çalışmalarında ise L-NAME verilerek NO sentezinin inhibisyonu da flep yaşamını artırmıştır. Sonuçlardaki çelişkinin nedeni deneysel modellerin farklılığı olabilir. Bununla birlikte eğer çalışılsa idi, farklı NO sentaz alt gruplarının düzeylerinin belirlenmiş olması, bu farklı sonuçların açıklanmasında yararlı olabilirdi.

Çalışmamızda bir gaz olan ve ölçülmesi bu nedenle güç olan NO'nin kendisinin ölçülmesi yerine, metabolitleri olan nitrit ve nitratlar değerlendirilmeye alınarak doku NO değerleri ile indirekt veriler elde edilmiştir. Bizim çalışmamızda NO'nin flep dokusunda artması önceki çalışmalarla uyumludur^{49,51,54}. Bununla birlikte sonuçlarımızın literatür bilgilerine uymayan tarafları da vardır: Bunlardan ilki; DFT tedavi gruplarında NO düzeyleri, kontrol grubuna kıyasla azalmış olmasına veya daha az artmış olmasına rağmen flep yaşamı artmamasıdır. Oysa ki Guo ve ark. L-NAME'in NO düzeyini azalttığını ve flep yaşamını artırdığını⁵¹, Knox ve ark. da L-NAME kullanılarak NO sentezini inhibe etmeyi amaçladıkları çalışmalarında flep yaşamının arttığını^{52,53} göstermişlerdir. İkincisi ise DFT'in iskemik dokularda NO düzeyine olan etkisidir. DFT, gerçi farklı şart ve modelde olsa da, Masini ve ark. larının çalışmalarında NO düzeyini artırmış iken¹⁶ bizim çalışmamızda iskemik flep dokusundaki NO düzeylerini azaltmış veya kontrol grubuna göre daha az bir artışa neden olmuştur. Adı geçen çalışmada iskemireperfüzyon oluşturulan domuz kalplerinde NO azalmış, DFT ise NO düzeyini ve koroner perfüzyonu artırmıştır¹⁶. Ancak yine bu çalışmada da artan NO'nin yapısal veya indüklenebilir NO sentazlardan hangisinin ürünü olduğu belirlenmemiştir.

Biz çalışmamızda NO düzeylerini fleplerin dolaşımının kritik olduğu iskemik bölgelerinden alınan deri örneklerinde ölçtük. Bu bölgelerde vücudun defans mekanizması olarak düşünülebilen indüklenebilir NO sentaz artışı olması⁵⁵, olağan, beklenen bir gelişmedir. Artmış indüklenebilir NO sentazın ürünü olan fazla NO'nin, süperoksit ile etkileşerek peroksinitritler gibi serbest radikaller oluşturarak doku hasarı yapma potansiyeli vardır⁵⁶. NO, indüklenebilir veya yapısal NO sentazlardan hangisinin ürünü olursa olsun dokuda yapabileceği muhtemel değişiklikler birbirinden farklı olmamalıdır. Yani artmış NO, ister yapısal isterse indüklenebilir NO sentazın ürünü olsun, kendisini ortaya çıkaran şartlardan bağımsız olarak davranan bir son üründür. Öyleyse iskemik bir bölümünde artmış olan NO doğal defans mekanizması olarak bozulmuş perfüzyonu arttırmaya çalışırken süperoksit ile etkileşerek doku hasarına neden olabilecektir. NO bu etkilerden birisini nasıl seçecektir? Bilmiyoruz. Bu açıdan bakıldığında artmış NO'nin sonuçları, kaynağından ve belki de bizim niyetimizden bağımsız olarak kendini gösterebilir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi beklenmeyen sonuçların

nedenleri bu gerçekte yatabilir. Bu şekilde düşünüldüğünde iskemireperfüzyonda artan NO kan akımını artırarak kalbi iskemik hasardan korurken, bir flep dokusunda (bizim çalışmamızdaki gibi) doku hasarı yapıcı etkisi doku perfüzyonunu artırıcı etkisinden baskın hale gelebilir. Böyle olduğunda DFT'in flep dokusunda normalde görülen NO artışını engellemesinin zararlı etkisi olduğunu önermek yanlış olabilir.

Çalışmamızın bir diğer tartışmalı sonucu DFT'in flep yaşamına iyileştirmemiş olmasıdır. Oysa biz literatür bilgilerine göre DFT'in flep yaşamı için faydalı olabileceğini öngörmüştük ve DFT'in iskemik donuk hasarlı tavşan kulaklarında canlılığı artırdığı da gösterilmişti⁵⁷. Adı geçen çalışmada donuk yaralanması oluşturulan kulaklarda NO düzeyleri ölçülmemişse de bir başka çalışmada Tercan ve ark. donukta NO düzeylerinin azaldığını bildirmişlerdir⁵⁸. Bu durumda NO açısından flep ve donuk hasarındaki patofizyolojik olayların farklı olduğu düşünülebilir; çünkü flepte NO düzeyi artarken, soğuk yaralanmasında azalmıştır. Bu durumda flep dokusunda ve soğuk yaralanmalı dokularda yaşam oranlarının DFT tarafından farklı olarak kabul edilmemesi tam bir uyumsuzluk olarak kabul edilmemelidir.

Sonuç olarak DFT, bizim modelimizde iskemik flep dokusunda total NO düzeylerindeki artışı, flep yaşamına faydalı bir etki göstermeden azalttı. Flep yaşamı ve NO sentez veya inhibisyonu ile ilgili tartışmalar nedeni ile daha detaylı çalışmalara ihtiyaç vardır.

Dr. İrfan ÖZYAZGAN

Erciyes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi Anabilim Dalı

38039 Melikgazi, KAYSERİ

KAYNAKLAR

1. Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric oxide: Physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev* 1991; 43: 109-42.
2. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101: 785-92.
3. Gribbe Ö, Lundeberg T, Samuelson UE, et al. Nitric oxide synthase activity and endothelial ultrastructure in ischemic skin-flaps. *Br J Plast Surg* 1997; 50: 483-490.
4. Lefer AM, Aoki N, Mulloy D. Coronary endothelium-protective effects of defibrotide in ischemia and reperfusion. *Naunyn-Schmiedeberg Arch Pharmacol* 1990; 341: 246-50.
5. Schrör K, Ackermann G, Hohlfeld T. Endothelial protection by defibrotide—a new strategy for treatment of myocardial infarction? *Z Kardiol* 1989; 78: 35-41.
6. Aoki N, Siegfried M, Tsao P, et al. Beneficial mechanisms of action of a prostacyclin enhancing agent in splanchnic artery occlusion shock. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 1988; 60: 275-89.

7. Hohlfeld T, Bucha E, Nowak G et al. Favorable effect of Defibrotide in lipid A-induced shock in pigs. *Circ Shock* 1992, 38: 122-9.
8. Fumagalli G, Angelaccio E, Lombardo N, et al. Morphometric and ultrastructural study of experimental venous thrombosis. Effects of defibrotide, an antithrombotic agent. *Haemostasis* 1987, 17: 361-70.
9. Fumagalli G, Sala C, Angelaccio E, et al. Thrombolytic activity of defibrotide: a morphometric evaluation in experimental venous thrombosis. *Pharmacol Res* 1989, 21: 293-8.
10. Hohlfeld T, Strobach H, Schrör K. Stimulation of endogenous prostacyclin protects the reperfused pig myocardium from ischemic injury. *J Pharmacol Exp Ther* 1993, 264: 397-405.
11. Ma XL, Porta R, Pescador R, et al. Novel beneficial mechanisms of defibrotide, a prostacyclin enhancing agent in splanchnic artery occlusion and reperfusion in rats. *Meth Find Exp Clin Pharmacol* 1991, 13: 667-74.
12. Gambassi F, Lupini M, Di Bello MG, et al. Histamine release by free radicals: effects of defibrotide (DFT) and its fraction 'PO 085 DV'. *Agents Actions* 1993, 38: Special Conference issue. C206-C208.
13. Pescador R, Porta R, Ferro L. An integrated view of the activities of Defibrotide. *Semin Thromb Hemost* 1996, 22: 71-5.
14. Thiernemann C, Löbel P, Schrör K. Usefulness of defibrotide in protecting ischemic myocardium from early reperfusion damage. *Am J Cardiol* 1985, 56: 978-82.
15. Berti F, Rossoni G, Della Bella D, et al. Nitric oxide and prostacyclin influence coronary vasomotor tone in perfused rabbit heart and modulate endothelin-1 activity. *J Cardiovasc Pharmacol* 1993, 22: 321-6.
16. Masini E, Lupini M, Mugnai L, et al. Polydeoxyribonucleotides and nitric oxide release from guinea-pig hearts during ischaemia and reperfusion. *Br J Pharmacol* 1995, 115: 629-35.
17. McFarlane RM, DeYoung G, Henry RA. The design of a pedicle flap in the rat to study necrosis and its prevention. *Plast Reconstr Surg* 1965, 35: 177-182.
18. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J Biol Chem* 1991, 193: 265-75.
19. Arto K, Avela K, Ranta V. The calcium-dependent nitric oxide production of human vascular endothelial cell in preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1976, 174: 1056-60.
20. Davidge ST, Stranka CP, Roberts JM. Urine but not plasma nitric oxide metabolites are decreased in women with preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 1976, 174: 1008-13.
21. Nieto CS, Garcia MIS, Garcia PB. A comparative study on the effect of various pharmacological agents on the survival of skin flaps in the rat. *Br J Plast Surg* 1992, 45: 113-6.
22. Finseth F, Adelberg M G. Prevention of skin flap necrosis by a course of treatment with vasodilator drugs. *Plast Reconstr Surg* 1978, 61: 738-43.
23. Finseth F. Clinical salvage of three failing skin flaps by treatment with a vasodilatory drugs. *Plast Reconstr Surg* 1979, 63: 304-7.
24. Nichter LS, Sobieski MW. Efficacy of verapamil in the salvage of random pattern skin flaps. *Ann Plast Surg* 1988, 21: 242-5.
25. Alexandrou K, Hata Y, Matsuka K, et al. Effect of beraprost sodium (Procyclin), a stable prostaglandin I₂ analogue on a dorsal skin flap model in rats. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1996, 30:17-22.
26. Reus W F, Murohy R C, Hegggers J P et al: Effect of intraarterial prostacyclin on survival of skin flaps in the pig: Biphasic response. *Ann Plast Surg* 1984, 13: 29.
27. Silverman D G, Brousseau D A, Norton K J, et al. The effects of a topical PGE₂ analogue on global flap ischemia in rats. *Plast Reconstr Surg* 1989, 84: 794-9.
28. Zachary L S, Hegggers J P, Robson M C, et al. Combined prostacyclin and thromboxane synthetase inhibitor UK 38485 in flap survival. *Ann Plast Surg* 1986, 17: 112-5.
29. Knight KR, Kawabata H., Coe SA., et al. Prostacycline and prostanoid modifiers aid ischaemic skin flap survival. *J Surg Res* 1991, 50: 119-23.
30. Marzella L, Jesudass RR, Manson PN, et al. Functional and structural evaluation of the vasculature of skin flaps after ischemia and reperfusion. *Plast Reconstr Surg* 1988, 81: 742-50.
31. 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, 86: 329-34.
32. Sasaki GH, Pang CY. Experimental evidence for involvement of prostaglandins in viability of acute skin flaps: effects on viability and mode of action. *Plast Reconstr Surg* 1981, 67: 335-40.
33. Nakatsuka T, Pang CY, Neligan P. Effect of glucocorticoid treatment on skin capillary blood flow and viability in cutaneous and myocutaneous flaps in the pig. *Plast Reconstr Surg* 1985, 76: 374-9.
34. Chu BC, Deshmuckh N. The lack of the effect pentoxifylline on random skin flap survival. *Plast Reconstr Surg* 1989, 83: 315-8.
35. Sawada Y, Hatayama I, Sone K. The effect of continuous topical application of heparin on flap survival. *Br J Plast Surg* 1992, 45: 515-8.
36. Knight KR, Dvir E, Kawabata HR, et al. Factors involved in salvaging ischemic rabbit skin flaps: ATP and free radicals but not thromboxane. *Br J Plast Surg* 1989, 42: 675-681.
37. Tan CM, Im MS, Myers RAM, et al. Effects of hyperbaric oxygen and hyperbaric air on the survival of island skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1984, 73: 27-8.
38. Im MJ, Lee WPA, Hoopes JE. Effect of electrical stimulation on survival of skin flaps in pigs. *Phys Ther* 1990, 70: 37-40.
39. Angel MF, Mellow CG, Knight KR, et al. The effect of deferoxamine on tolerance to secondary ischemia caused by venous obstruction. *Br J Plast Surg* 1989, 42: 422-4.
40. Bekerecioğlu M, Tercan M, Özyazgan İ. The effect of Ginkgo biloba extract (Egb 761) as a free radical scavenger on the survival of skin flaps in the rat: a comparative study. *Scand J Plast and Reconstr Surg Hand Surg* 1998, 32: 135-9.
41. Im MJ, Manson PM, Bulkley GB, et al. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of island skin flaps. *Ann Surg* 1985, 201: 357-359.

42. 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, 102: 2040-8
43. Palmer RMJ, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988, 333: 664-6.
44. Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980, 288: 373-6.
45. Moncada S. The L-arginine: nitric oxide pathway. *Acta Physiol Scand* 1992, 145: 201-27.
46. Radomski MW, Palmer RM, Moncada S. An L-arginine: nitric oxide pathway present in human platelets aggregation. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990, 87: 5193-7.
47. Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The role of nitric oxide and cGMP in platelet adhesion to vascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* 1987, 148: 1482-9.
48. Cordiero PG, Mastorakos DP, Hu QY, et al. The protective effect of l-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg* 1997, 100: 1227-33.
49. Oshima H, Inoue H, Aihara M, et al. Physiological roles of endothelium derived nitric oxide in the epigastric island flaps of rabbits. *Ann Plast Surg* 1997, 6:608-614.
50. Gribbe Ö, Lundeberg T, Samuelson UE, et al. Dexamethasone increases survival and attenuates induction of inducible nitric oxide synthase in experimental skin flaps. *Ann Plast Surg* 1999, 42: 180-4.
51. Guo J, Lu K, Guo S. [The function of nitric oxide in the necrosis of avulsed skin flap in domestic pig]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* 1997, 11: 65-8.
52. Knox LK, Angel MF, Gamper T, et al. Secondary ischemic tolerance improved by administration of L-NAME in rat flaps. *Microsurgery* 1996, 17: 425-7.
53. Knox LK, Stewart AG, Hayward PG, et al. Nitric oxide synthase inhibitors improve skin flap survival in the rat. *Microsurgery* 1994, 15: 708-11.
54. Oshima H. The influence of skin flap ischemia on serum nitric oxide concentrations. *Microsurgery* 1996, 17: 191-7.
55. Moilanen E, Vapaatalo H. Nitric oxide in inflammation and immune response. *Ann Med* 1995, 27: 359-67.
56. Freeman B. Free radical chemistry of nitric oxide. Looking at the dark side. *Chest* 1994, 105: 79S-84S.
57. Özyazgan İ, Tercan M, Bekerecioğlu M, et al. Defibrotide activity in experimental frostbite injury. *Brit J Plast Reconstr Surg* 1998, 51: 450-4.
58. Tercan M, Türköz Y, Çekmen M, et al. Decreased serum nitric oxide level in experimental frostbite injury: A preliminary study. *The Medical Journal of Kocatepe (Afyon Kocatepe Üniversitesi)* 2001, 2: 59-64.