

T.C.
NAMIK KEMAL ÜNİVERSİTESİ
BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJELERİ
KOORDİNASYON BİRİMİ(NKÜBAP)

BİLİMSEL ARAŞTIRMA PROJESİ
SONUÇ RAPOR

NKUBAP.00.20.AR.15.01 nolu proje
Kersetinin Ratlarda, Yanık Staz Bölgesi Üzerindeki Etkisi

Yürütücü: Yrd. Doç Dr A. Erkan Orhan
Araştırmacı: Yrd. Doç. Dr Özgür Gündüz
Öğr. Gör. Dr. Oktay Kaya
Yrd. Doç. Dr. Melike Sapmaz Metin
Doç. Dr. Yener Topçu Tarladaçalışır
Yrd. Doç. Dr. Ertan Şahin

2016

Önsöz

Yanıkta hasarlanmış doku miktarının en az seviyede tutulması, tedavinin temel amaçlarından biridir. Yanığa travmasına esas maruz kalan ve hasar gören dokunun çevresinde, erken dönemde yaşamını sürdüren fakat zaman içinde nekroza giden bir bölge vardır ve bu bölgeye staz zonu adı verilmektedir. Bu bölgedeki dokuların korunması yanık sonrası hasarlanmış doku miktarının azaltılmasına olanak sağlamaktadır. Bu bölgedeki dokuların korunması için birçok madde ve yöntem denenmiş olsa da hiçbiri klinik uygulamaya geçmemiştir. Biz, bitkisel kaynaklı bir flavonoid olan kersetinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özellikleri ile yanık staz zonu dokuları yaşayabileceğini arttıracak hipotezi ile bu projeyi planladık. Bu projede amacımız ratlarda akut ve kronik kersetin tedavisinin yanık staz bölgesindeki dokuların yaşayabilirliği artırıp artıramadığını ve yanık staz zonunda oluşan otofaji ve apoptoz üzerindeki etkisini göstermektir. Projemiz Namık Kemal Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimi Tarafınca desteklenmiştir.

Yrd. Doç. Dr. A. Erkan Orhan

İçindekileri

Tablo ve şekiller.....	1
Özet.....	2
Abstract.....	3
Proje Ana Metni.....	4
Giriş.....	4
Gereç ve Yöntem.....	6
Bulgular.....	13
Tartışma/Sonuç.....	25
Kaynaklar.....	37

Tablo ve Şekiller

Tablo 1: Gruplara göre 7.gündeki staz zonunda yaşayan doku miktarı ve PCNA düzeyleri.

Tablo 2: Gruplara ve doku örneği alınma zamanlarına göre laboratuvar ölçümleri.

Tablo 3: Gruplara göre 24.saatteki apoptoz ve otofaji düzeyleri.

Resim 1: Comb yanık modeline uygulanması.

Resim 2: Yanık işlemi sonrası dokuların görünümü.

Resim 3: 7. günde gruplardaki nekroz alanlarının görünümü.

Resim 4: Grupların sintigrafik görüntüleri.

Resim 5: 7. gündeki histolojik görünüm.Tüm gruplarda reepitelizasyonizlenmekte (HE boyama, x400 büyütme).

Resim 6: Gruplardaki apoptotik hücrelerin görünümü (TUNEL boyama x400 büyütme).

Resim 7: Gruplardaki apoptotik hücrelerin görünümü (antibeklin boyama x400 büyütme).

Resim 8: Gruplardaki proliferasyonun görünümü (PCNA boyama x400 büyütme).

Şekil 1: Gruplara göre 7.gündeki staz zonunda yaşayan doku miktarı.

Şekil 2: Gruplardaki MPO düzeyleri.

Şekil 3:Gruplardaki MDA düzeyleri.

Şekil 4: Gruplardaki nitrotirozin düzeyleri.

Şekil 5: Gruplardaki apoptoz düzeyleri.

Şekil 6: Gruplardaki otofaji seviyesi.

Özet

Yanık tedavisinde esas amaç hasarlanan doku miktarının minimal seviyede tutmaktır. Yanık alanın genişlik ve derinliğinin miktarı hastaların mortalite ve morbiditesini belirleyen temel faktördür. Staz zonu olarak tanımlanan ve koagulasyon alanını çevreleyen alan yanık sonrası oluşacak nekrozun derinlik ve genişliğini belirleyen kritik bölgedir. Birçok ajan staz zonundaki dokularının korunması için denenmiştir. Bu deneysel çalışmada birçok değişik doku üzerinde antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik etkisi olduğu bilen kersetinin yanık staz zonu üzerindeki etkisi incelenmektedir. Çalışmada kersetin tedavisi yapılmayan, akut(yanık sonrası tedaviye başlanan) kersetin tedavisi yapılan ve kronik(yanık öncesi tedaviye başlanan) kersetin tedavisi yapılan gruplar karşılaştırıldı. Tedavi sonrası yanık yarası genişliği planimetrik ve sintigrafik olarak değerlendirildi. Ek olarak doku örnekleri alınarak malondialdehyde(MDA), myeloperoksidaz(MPO) ve nitrotirozin seviyeleri, kersetinin antiinflamatuvar ve antioksidan etkisinin gösterilmesi için ölçüldü ve doku örneklerinde apoptoz ve otofaji seviyesi belirlendi. Kersetin ile tedavi edilen gruplarda nekroz miktarının ve apoptozun kontrole göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha az olduğu, otofajinin de kontrol grubunda, kersetin ile tedavi edilen gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha fazla olduğu görüldü. MDA,MPO and nitrotirozin ölçüm değerlerini bakımında gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde bir fark tespit edilmedi. Sonuç olarak bu çalışma da kersetinin staz zonu üzerinde koruyucu etkisi olduğunu göstermiştir.

Anahtar Kelimeler: Kersetin; staz zonu; apoptoz; otofaji; yanık

Abstract

Keeping the amount of damaged tissue at a minimum is one of the primary goals of treatment in burns. The width and depth of the burned area is at the top of the factors affecting mortality and morbidity in patients. The zone of stasis, the encircling area of the zone of coagulation, is a critical area which determines the depth and width of the necrosis in burns. Many agents were proposed to salvage the zone of stasis. Due to the known antioxidant, antiinflammatory and antiapoptotic effects of quercetin on multiple tissue, the effect of quercetin on saving the zone of stasis was investigated in this experimental study. No quercetin treatment, acute (treatment started after burn injury) quercetin treatment and chronic (treatment started before burn injury) quercetin treatment was compared in a rat comb-burn model. The extent of burn wounds was evaluated by planimetry and scintigraphy in the groups. Additionally, skin samples were obtained to analyze malondialdehyde (MDA), myeloperoxidase (MPO), nitrotyrosine to see antiinflammatory and antioxidant effect of quercetin and apoptosis and autophagy levels were evaluated. Necrosis rate and apoptosis were statistically significant lower in quercetin treatment groups and autophagy level were statistically significant lower in control group. There were no difference between the groups in terms of MDA, MPO and nitrotyrosine concentrations. In conclusion, this study showed us the possible saving effect of quercetin on the zone of stasis.

Key words: Quercetin; zone of stasis; apoptosis; autophagy; burn

Proje Ana Metni

GİRİŞ

Yanık yarasının genişlik ve derinliğinin artması erken dönemde sıvı kaybının artmasına ve şok, sepsis, multiorgan yetmezliği gibi ölümcül komplikasyonların daha fazla oluşmasına (Grunwald, 2008) geç dönemde ise yaranın geç iyileşmesi hipertrofik skar oluşması, pigmentasyon bozukluklarına ve kontraktür gelişmesine neden olmaktadır(Shakespeare, 2001; Singh, 2007). Bu nedenlerle de hastaların daha fazla medikal ve cerrahi tedavi gereksinimi olmakta ve moraliye(ölüm) ve morbiditeleri artmaktadır(Johnson, 2003). Yanık tedavisinde hasarlanmış doku miktarının en az seviyede tutulması, tedavinin temel amaçlarından biridir.

1953 yılında Jackson yanık nedeni ile etkilenmiş dokuları hasarın ağırlığı ve kan akımı değişimlerine göre 3 bölgeye ayırmıştır. Yanık nedeni ile dokuların geri dönüşsüz hasarlandığı ve koagulasyon nekrozunun olduğu merkezdeki bölgeye koagulasyon zonu adı verilmektedir. Bu bölgeyi çevreleyen, travma sonrası dokuların indirekt olarak hasar gördüğü bölgeye, staz zonu adı verilmektedir. En dıştaki travma sonrası doğrudan hasarın olmadığı, travmaya cevap olarak kan akımının arttığı ve inflamatuvar cevabın geliştiği bölgeye ise hiperemi zonu adı verilmiştir (Jackson, 1953). Staz bölgesindeki dokular yanık travmasından hemen sonrası canlılıklarını sürdürseler bile, ödem, uzamış inflamasyon, serbest oksijen radikallerin oluşması, sitotoksik sitokinlerin ortamda toplanması, hiperkoabilite gibi sebeplerle kan akımı azalması 48 saat içinde doku nekrozu oluşmasına (Shupp, 2010) ve bu durum da yanık genişlik ve derinliğinin artmasına neden olmaktadır(Tan, 2013).

Staz bölgesindeki dokularda termal enerjiye maruziyet sonrası inflamasyon oluşmakta vasküler geçirgenlik artmakta ve doku ödemi görülmektedir. Bu inflamasyon sırasında ortamda toplanan nötrofillerden sitotoksik sitokinler ve serbest oksijen radikalleri(ROS) salınmaktadır. Yanıkta inflamasyonun uzaması nedeniyle ortamdaki aşırı miktarda biriken sitokin ve ROS'ları antioksidan mekanizmalar dengeleyememekte ve bunun sonucunda da lipid, protein ve nükleik asid gibi vital yapılarda hasarlanma olmaktadır(Shupp, 2010). İnflamasyon sırasından nötrofillerin postkapiller venüllerde aşırı toplanması damarlarda tıkanmaya neden olmakta ve dokuların perfüzyonu azalmaktadır. (Gravante, 2006). Bu değişimler staz zonundaki dokuların iskemik ve nekrotik hale gelmelerine neden olur(Eski, 2011). Yapılan çalışmalarda staz bölgesinde ilk 24 saate otofaji olduğu, ilk 48 saatte de apoptozun yoğun şekilde olduğu, 48 saaten sonra ise nekrozun daha yoğun olarak olduğu görülmüştür(Tan, 2013). Özetle Staz bölgesindeki patofizyolojinin mekanizması inflamasyon, ve nötrofillerin toplanması, ROS salınımı ve apoptoz olmasıdır.

Staz zonundaki hasarın reversible olması nedeni ile bu alandaki dokuların korunması için antitrombotik, antikoagulan, antiinflamatuvar ve antioksidanlar ajanlar kullanılarak birçok deneysel çalışma yapılmış ve belli başarılar elde edilmiştir(Uygur, 2009).

Kersetin(3,3⁰,4⁰,5,7-pentahydroxyflavone) flavonol tip bir flavonoiddir. Başta turunçgilleri, soğan, brokoli olmak üzere birçok sebze ve meyvelerde bulunmaktadır ve insanları diet ile aldıkları en beligin flavonoittir(Kimura, 2009).

Kersetinin en potent reaktif oksijen türlerine (ROS) karşı temizleyici flavonoidlerden biridir. Kersetinin aynı zamanda anti-inflamatuvar etkinliği de vardır. Birçok çalışma kersetinin antifibrinolitik, antikoagulan, antibakteriyel, antiapoptotik ve antiproliferatif etkisi olduğu gösterilmiştir(Chen, 2014).

Bizim hipotezimiz; kersetinin antioksidan, antiinflamatuvar ve antiapoptotik özelliği ile yanık staz bölgesi dokularının yaşayabilirliğini arttıracaktır. Bu çalışma ile amacımız ratlarda akut ve kronik kersetin tedavisi ile yanık staz bölgesindeki dokuların yaşayabilirliği üzerindeki etkisini göstermektir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma için Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Yerel Etik Kurulu'ndan onay alındı ve Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvar'ında yapıldı. Çalışma için Trakya Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvar'ında üretilmiş ağırlıkları 250- 350 gr olan 48 adet Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar uygun kafeslerde, ortalama 20 C sıcaklıkta ve 12 saat karanlık 12 saat aydınlık ortamın sağlandığı koşullarda barındırıldı.

Tüm cerrahi işlemler %10'luk ketamine HCl (50 mg/kg- Alfamine ®- IM) ve ksilazin HCl (2,5 mg/kg- Rompun ®- IM) anestezisi altında, aynı cerrah tarafından steril koşullarda gerçekleştirildi. Cerrahi işlem sonrası dönemde ratların birbirlerine zarar vermelerini önlemek amacıyla, hayvanlar ayrı kafeslerde tutuldu. Tüm ratlara standart rat yemi verildi ve herhangi bir su ve yem kısıtlaması yapılmadı.

Ratlar 3 gruba ayrıldı ve her grupta kendi içinde 2 alt gruba ayrıldı bu şekilde her birinde 8 rat olacak şekilde 6 grup oluşturuldu.

Grup 1a ve grup 1b'deki ratlara yanık prosedürü öncesi 7 gün boyunca ve yanık

sonrası hemen başlanarak ötenazi yapılincaya kadar günlük 1 ml dimethylsulfoxide(DMSO) intraperitoneal uygulandı.

Grup 2a ve Grup 2b'deki ratlara yanık prosedürü öncesi 7 gün boyunca günlük 1 ml DMSO ve yanık prosedüründen hemen sonra başlanarak ötenazi yapılincaya kadar günlük 1 ml DMSO içinde çözülmüş 50mg/kg kersetin intraperitoneal olarak uygulandı

Grup 3a ve Grup 3b'deki hayvanlara yanık prosedürü öncesi 7 gün boyunca ve yanık sonrası hemen başlanarak ötenazi yapılincaya kadar günlük 1 ml DMSO içinde çözülmüş 50mg/kg kersetin intraperitoneal olarak uygulandı.

Her grup 'a' ve 'b' olarak isimlendirilecek 2 alt gruba ayrıldı

'a' alt grubundaki hayvanlara (grup 1a, grup 2a, grup 3a) yanık prosedüründe 24 saat sonra yüksek doz anestezi madde verilerek ötenazi yapıldı. Bu gruptaki hayvanlardan alınan doku örneklerinde, biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı.

'b' alt grubundaki hayvanlara (grup 1b, grup 2b, grup 3b) yanık prosedüründen 7 gün sonra yüksek doz anestezi madde verilerek ötenazi yapıldı. Bu gruplarda önce sintigrafik ve makroskopik inceleme yapıldı daha sonra alınan doku örneklerinde biyokimyasal, histopatolojik ve immunohistokimyasal incelemeler yapıldı.

Yanık prosedürü

40mg/kg Ketamin ve 10 mg/kg Xylazin ile anestezi sağlandıktan sonra hayvanların sırt bölgeleri traş edildi. Uygun antiseptik uygulama sonrası Regas ve Ehrlich (Regas, 1992)'in tanımladığı Comb yanık modeline uygun olarak 10 x 20 mm boyutlarında 4 adet kolu ve aralarında 5 mm x10 mm boyutlarında 3 adet boşluğu olan özel yapım

elik plak kaynar su içinde 15 dk tutulacak ve daha sonra havyanların sırt bölgesinde orta hatta 20 saniye boyunca basınç oluşturulmadan temas ettirildi. Bu şekilde metal plağın kollarının sırt bölgesine temas ettikleri yerlerde yanık ve arada kalan bölgelerde ise yanık staz bölgesi oluştu(Resim 1,2).



Resim 1: Comb yanık modeline uygulanması



Yanık işleminden hemen sonra

Yanık işleminden 24 saat sonra

Yanık işleminden 7 gün sonra

Resim 2: Yanık işlemi sonrası dokuların görünümü

Makroskopik inceleme:

Staz bölgeleri milimetrik kağıt üzerine çizilerek nekrotik bölgenin alanı hesaplandı ve staz bölgesinin toplam alanına oranlanarak yüzde cinsinden nekrotik alan miktarı hesaplandı. Elde edilen sonuçlar gruplar arasında karşılaştırıldı.

Sintigrafik inceleme

Grup 1b, Grup 2b ve Grup 3b'deki ratlar içinden, her gruptan rastgele 2 rat şekilde ve yanık işleminden 7 gün sonra Ketamin+Xylazin ile anestezi sağlandıktan sonra intravenöz 2cc 111 MBq (3 mCi) technetium-99m methoxyisobutylisonitrile ($^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI) verildi ve yarım saat sonra yüksek doz anestezi ile ötenazi yapıldı. Yanık alanları

Çevredeki 2 cm normal deri ile beraber panniculus carnosusu dahil edilerek eksize edildi. $^{99}\text{Tc}^{\text{m}}$ -MIBI enjeksiyonundan 1 saat sonra spesmenlerin sintigrafik grntleri gamma kamera kullanılarak tespit edildi. Görüntülerde yanık bölgeleri arasındaki rölatif olarak linear artan aktiviteler vital alan olarak değerlendirilecek ve piksel sayıları sayılarak oranlama yapıldı.

Biyokimyasal lmler:

Deneklerden elde edilen doku örnekleri homojenize edilerek ;

İnflamasyonla ilişkili olduğu bilinen MPO değeri, üreticinin tarifine uygun olarak yapılan işlemler ile ticari ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü. Meydana gelmesi beklenen oksidatif hasar ve antioksidan savunma sisteminin değerlendirilmesi amacıyla malondialdehit (MDA), ve nitrotirozin değerleri, üreticinin tarifine uygun olarak yapılan işlemler ile ticari ELISA kitleri kullanılarak ölçüldü.çalışma planı yapılırken superoksit dismutaz (SOD) düzeyi ölçülmesi planlanmıştır fakat SOD ELISA kitinde oluşan teknik problem nedeni ile ölçüm yapılamamıştır

Histopatolojik İnceleme

Doku rnekleri %10 formalin içinde fikse edildi ve daha sonra standart dehidratasyon ve parafinde dondurma işlemleri yapıldı. 5 m kalınlığında deri kesitleri kesildi ve hemotoksilen eosin boya ile boyandı ve x400 büyütmede değerlendirildi (H&E).

Terminal deoxynucleotidyl (TUNEL) inceleme

Apoptozu tespit etmek için TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling) tahlili, in situ apoptoz tespit etme kiti (ApopTag Plus Peroxidase in Situ Apoptosis Detection Kit; S7101-KIT, EMD Millipore), reticinin tarifine göre uygulandı.

Slaytlar ışık mikroskopunda yüksek çözünürlükte x400 büyütmede değerlendirildi. Çekirdekleri kahverengi boyanmış hücreler TUNEL pozitif hücreler olarak değerlendirildi ve her staz zonu kesitinde rastgele olarak seçilmiş 10 alanda sayıldı. Veriler her örnekte ortalama hücre sayısı olarak hesaplandı.

İmmunhistokimyasal İnceleme

Formalinde tespit edilmiş ve paraffin içine gömülmüş deri dokularından 5µm kalınlığında kesitler alındı.İmmunhistokimyasal işlem için kesitler deparafinize ve rehydrate edildi ve heat-mediated antigen retrieval uygulandı. Daha sonra kesitler %3 hidrojen perokside 10 dakika boyunca maruz bırakıldı. Primer antiyen proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 1:20,000, (Cell Signaling, USA); anti-beclin; 1:100, (Novus, USA) ile gece boyu inkübasyon sonrası proksidaz bağlı seconder antijenler eklendi. İmmunreaktivite diaminobenzidine (DAB; Vector Laboratories) ile izlendi ve karşı boyama olarak hematoxilen kullanıldı.

Proliferasyon indeksi PCNA ile tespit edildi. Çekirdekleri kahverengi boyanan hücreler PCNA pozitif hücreler olarak tanımlandı ve immunreaktivite, her staz zonu kesitindeki rastgele olarak seçilen 10 adet alan yüksek çözünürlükte x400 büyütmede, PCNA ile boyanan hücreler HSCORE(histolojik skor) a göre tespit edildi.(1:az, 2: orta ve 3:çok). Veriler her örnekte ortalama hücre sayısı olarak belirlendi. Slaytlar çift kör şekilde incelendi ve skorlandı

İstatistiksel Analiz:

Devamlı değişkenlerin dağılımının normal olup olmadığı Shapiro Wilk testi ile değerlendirildi. Levene testi varyansların homojenitesini değerlendirmek için kullanıldı. Veriler ortama $\pm$ standart sapma veya ortanca (%25- %75) olarak gösterildi.

Gruplar arasındaki farklılık, eğer değişkenler normal dağılmış ise One-Way ANOVA testi ile normal dağılmamış ise Kruskal Wallis testi ile belirlendi. One-Way ANOVA testi ile p-değeri istatistiksel olarak anlamlı ise post-hoc Tukey HSD testi hangi grubun diğerlerinden anlamlı olduğunun gösterilmesi için kullanıldı. Aynı control veya tedavi grubunda 24. Saatte ötenazi yapılan ve 7. Günde ötenazi yapılan gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farkın olup olmadığı Student's t or Mann Whitney U testi ile değerlendirildi.

Veri analizleri için IBM SPSS Statistics version 17.0 software (IBM Corporation, Armonk, NY, USA) programı kullanıldı. p değerinin 0.05'den az olması istatistiksel olarak anlamlı Kabul edildi.

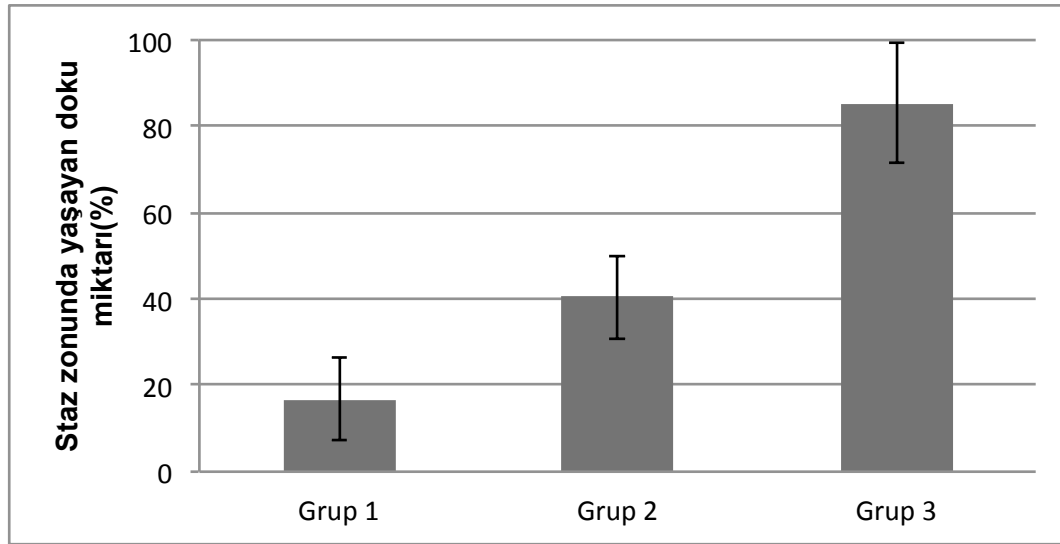
BULGULAR

Makroskopik İnceleme Bulguları

Tablo 1: Gruplara göre 7.gündeki staz zonunda yaşayan doku miktarı ve PCNA düzeyleri

	Staz zonunda yaşayan doku miktarı(%)	PCNA
Grup 1	16.81±9.48 ^{a,b}	50.40±3.65 ^{a,b}
Grup 2	40.37±9.75 ^{a,c}	33.80±8.70 ^a
Grup 3	85.41±14.06 ^{b,c}	30.00±10.80 ^b
p-değeri †	<0.001	0.006

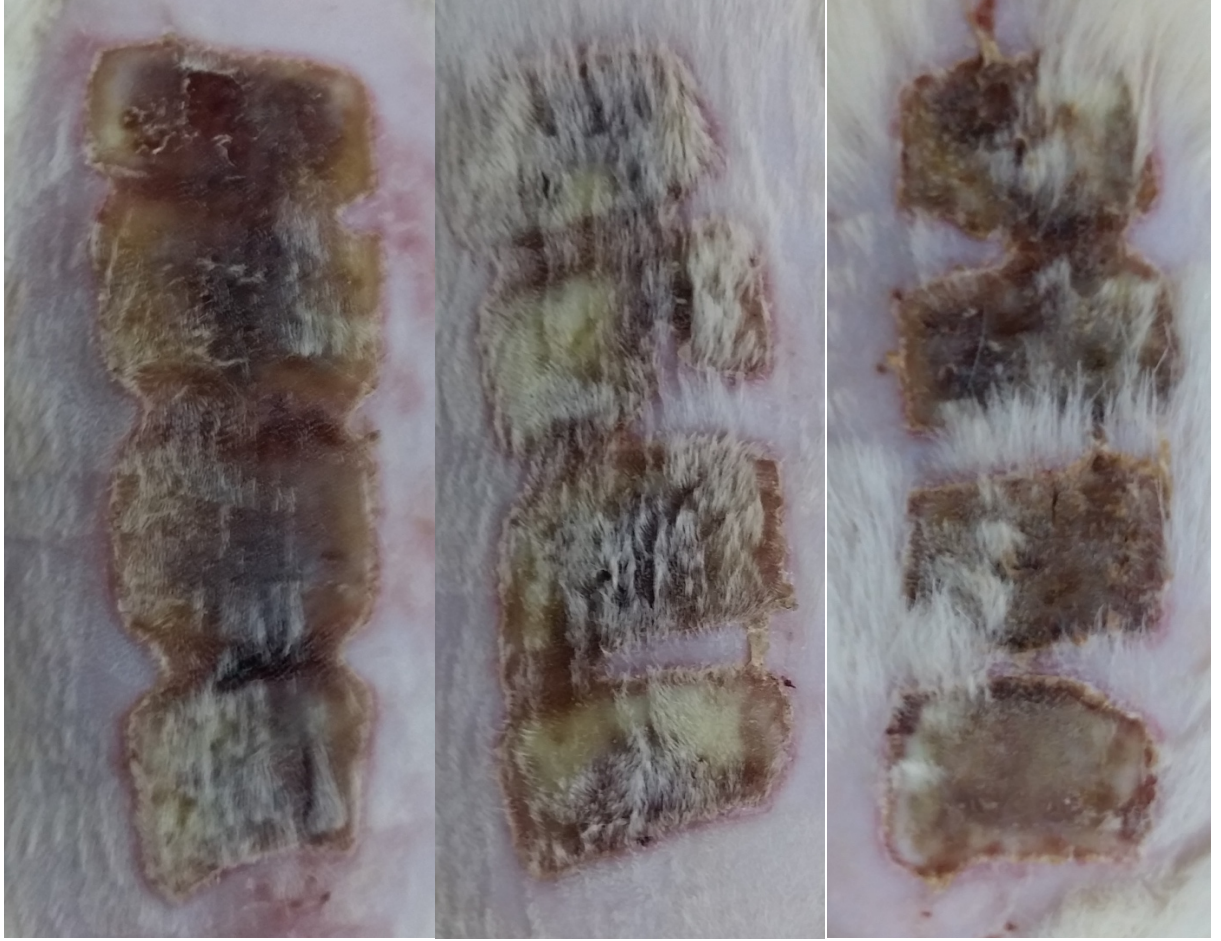
† One-Way ANOVA, a: Group 1 vs Group 2 (p<0.05), b: Group 1 vs Group 3 (p<0.01), c: Group 2 vs Group 3 (p<0.001).



Şekil 1: Gruplara göre 7.gündeki staz zonunda yaşayan doku miktarı

Grup 1b'deki deneklerin staz bölgesindeki dokuların ortalama %16.81(±9.4)'inin yaşadığı, grup 2b'deki deneklerin staz bölgelerindeki dokuların ortalama

%40.37($\pm$ 9.75)'inin yaşıdığı, grup 3b'deki deneklerin staz bölgelerindeki dokuların ortalama %85.41($\pm$ 14.06)'inin yaşıdığı hesaplandı. İstatistiksel olarak gruplar karşılaştırıldığında Grup 3b'deki yaşayan doku miktarının grup 1b ve grup 2b'den($p=0.002$ ve $p<0.001$), grup 2b'deki yaşayan doku miktarının ise grup 1b'den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekile daha yüksek olduğu tespit edildi($p<0.001$). (Tablo 1)(Resim 3)(Şekil 1)



Grup 1b

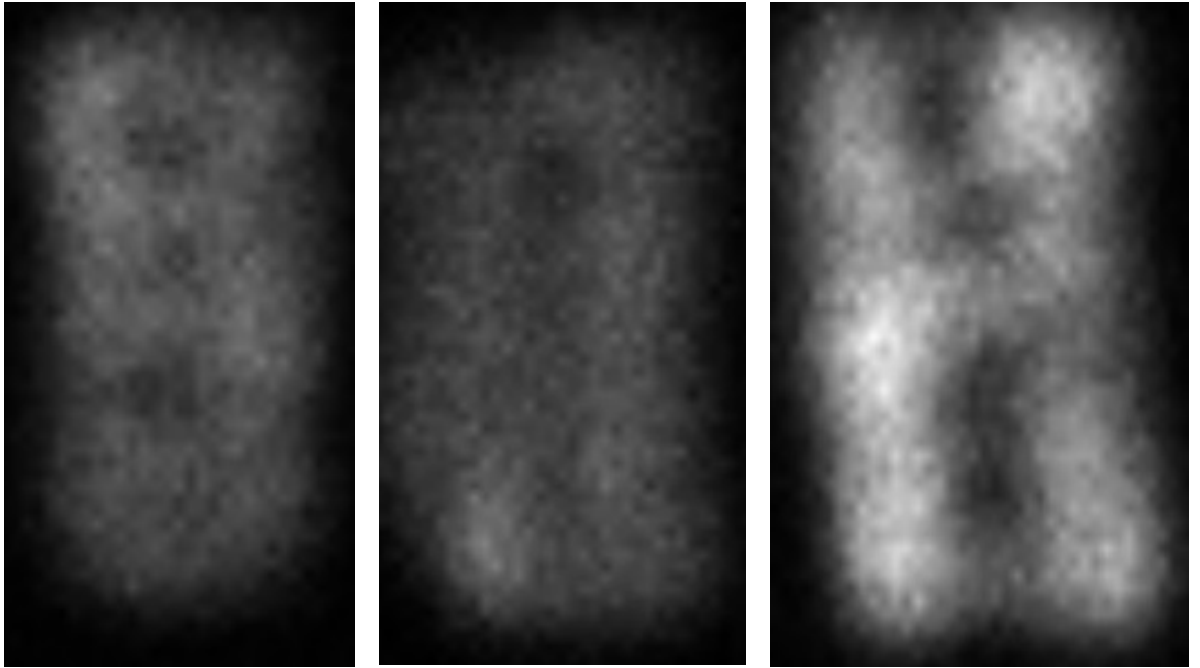
Grup 2b

Grup 3b

Resim 3: 7. günde gruptaki nekroz alanlarının görünümü

Sintigrafik değerlendirme

Çalışma sırasında teknik imkanlardaki kısıtlılık nedeni ile tüm hayvanlara sintigrafi yapılamamış her gruptan sadece 2 deneğe sintigrafi uygulanmıştır. Sintigrafi yapılan grup 3b 'deki ratların gama sayımı 7975.72 ve 8165. 61, grup 2b'deki deneklerde 7240, 55 ve 7080.60 ve grup 1b'deki deneklerde 6110.95 ve 6350.45 olarak ölçölmüştür. Örnek sayısının az olması nedeni ile istatistiksel karşılaştırma yapılmamıştır(Resim 4).



Grup 1

Grup 2

Grup 3

Resim 4: Grupların sintigrafik görüntöleri

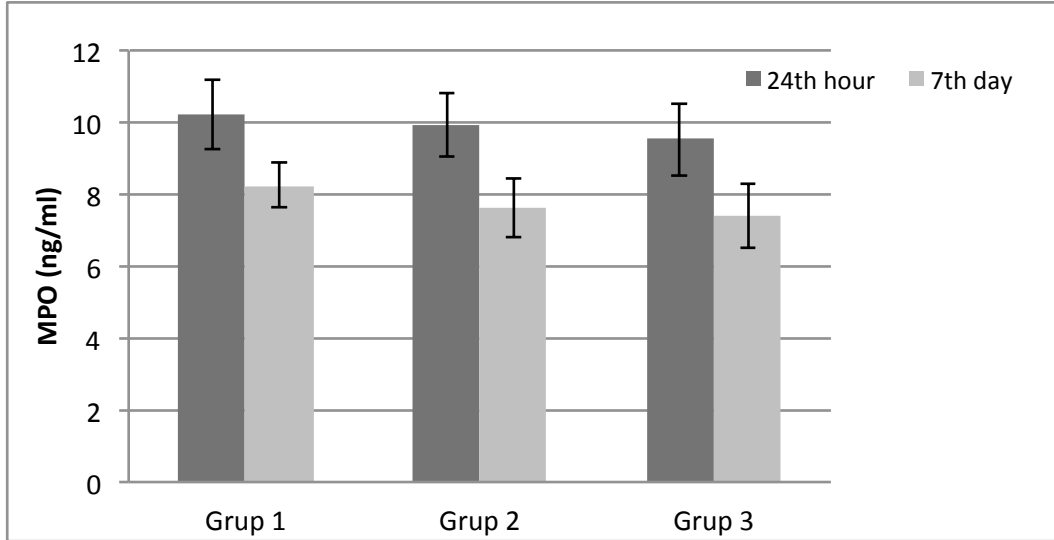
Biyokimyasal Bulgular

Tablo 2: Gruplara ve doku örneği alınma zamanlarına göre laboratuvar ölçümleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	p-değeri ^a
MPO(ng/ml)				
24. saat	10.20±0.95	9.94±0.89	9.52±1.00	0.422†
7. gün	8.25±0.61	7.62±0.83	7.41±0.91	0.216†
p-değeri ^b	<0.001¶	<0.001¶	0.006¶	
MDA(ng/ml)				
24. saat	7.09 (4.85-7.61)	3.76 (1.51-8.87)	3.22 (0.90-7.62)	0.519‡
7. gün	18.98(10.95-20.25)	17.42(11.02-27.15)	14.05(9.53-19.57)	0.589‡
p-değeri ^b	<0.001\$	<0.001\$	<0.001\$	
Nitrotyrosine(ng/ml)				
24. saat	249.47±24.42	245.55±22.01	239.03±24.79	0.682†
7. gün	228.77±40.09	199.33±28.92	194.31±22.32	0.164†
p-değeri ^b	0.253¶	0.010¶	0.005¶	

a: Aynı grubun doku örneği alınma zamanına göre karşılaştırılması, b: Aynı doku örneği alınma zamanında grupların birbirleri ile karşılaştırılması. † One-Way ANOVA, ‡ Kruskal Wallis test ¶ Student's t test, \$ Mann Whitney U test.

Kontrol ve deney gruplarında staz zonundan 24. saatte ve 7. günde alınan doku örneklerinde ELISA kiti ile MPO değerleri ölçülmüştür.



Şekil 2: Gruplardaki MPO düzeyleri

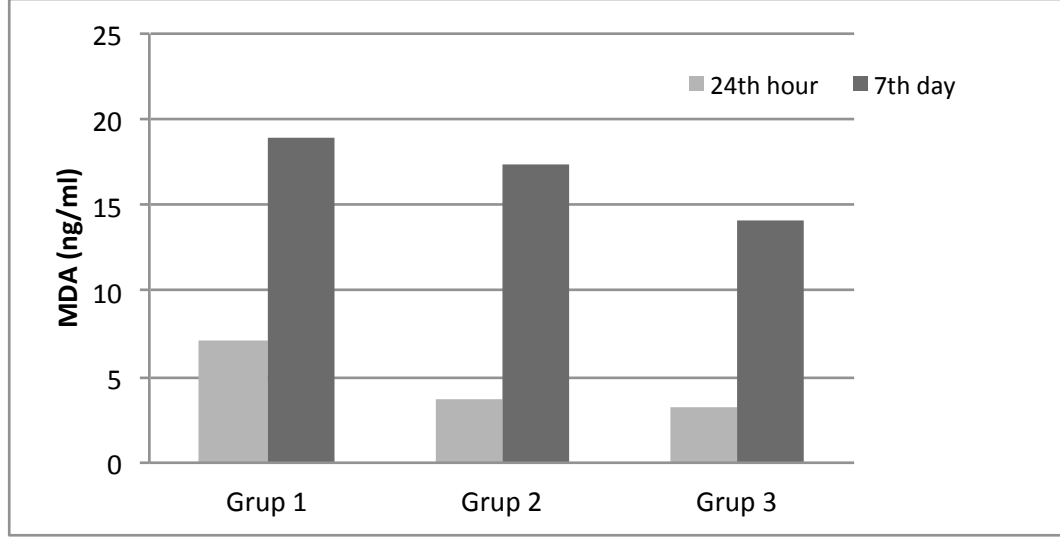
Grup 1a 'da 24 saatte elde edilen MPO değeri ortalaması $10.20(\pm 0.95)$ ng/ml, grup 2a'da $9.94(\pm 0.89)$ ng/ml ve grup 3a'da $9.52(\pm 1.00)$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p:0.422$).

Grup 1b 'da 7. günde elde edilen MPO değeri ortalaması $8.25(\pm 0.61)$ ng/ml, grup 2b'de $7.62(\pm 0.83)$ ng/ml ve grup 3b'de $7.41(\pm 0.91)$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir ($p:0.216$).

Her deney ve tedavi grubunda 24. saat ve 7. günde elde edilen MPO değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise MPO değerinin Grup1b'de grup 1a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşük olduğu ($p<0.01$), Grup2b'de grup 2a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşük olduğu ($p<0.01$), Grup 3b'de

grup 3a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha düşük olduğu tespit edilmiştir(p:0.06)(Tablo 2)(Şekil 2).

Kontrol ve deney gruplarında staz zonundan 24. saatte ve 7. günde alınan doku örneklerinde ELISA kiti ile MDA değerleri ölçülmüştür.



Şekil 3:Gruplardaki MDA düzeyleri

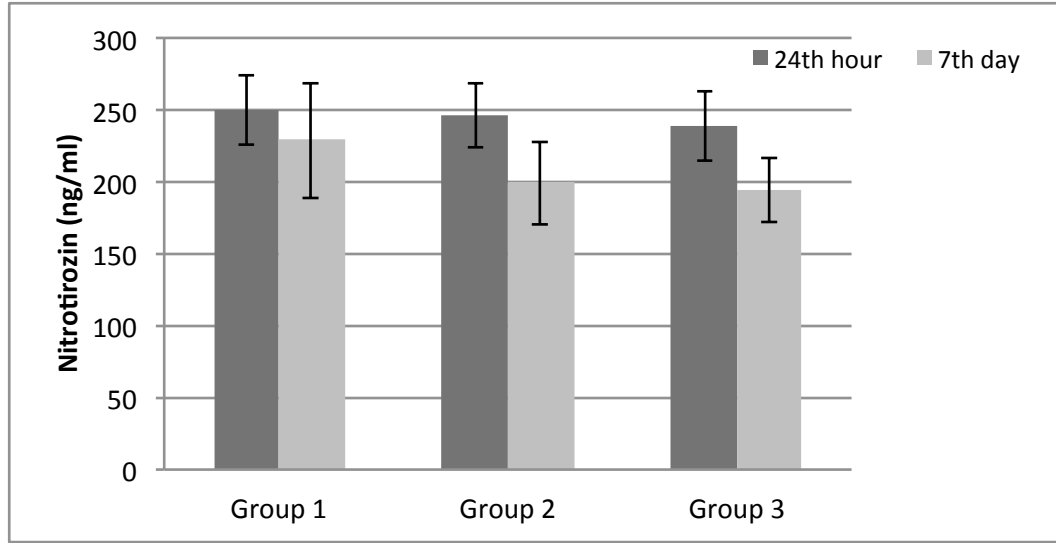
Grup 1a 'da 24 saatte elde edilen MDA değeri ortalaması 7.09(4.85-7.61)ng/ml , grup 2a'da 3.76(1.51-8.87)ng/ml ve grup 3a'da 3.22(0.90-7.62)ng/ml olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir(p:0.519).

Grup 1b 'da 7. günde elde edilen MDA değeri ortalaması 18.98(10.95-20.25)ng/ml, grup 2b'de 17.42(11.02-27.15)ng/ml ve grup 3b'de 14.05(9.53-19.57)ng/ml olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir(p:0.589).

Her deney ve tedavi grubunda 24. saat ve 7. günde elde edilen MDA değerleri kendi aralarında karşılaştırıldığında ise MDA değerinin Grup1b'de grup 1a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek olduğu(p<0.01), Grup2b'de grup 2a'dan

istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek olduğu($p<0.01$), Grup 3b'de grup 3a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha yüksek olduğu tespit edilmiştir($p<0.01$)(Tablo 2)(Şekil 3).

Kontrol ve deney gruplarında staz zonundan 24. saatte ve 7. günde alınan doku örneklerinde ELISA kiti ile nitrotirozin değerleri ölçülmüştür.



Şekil 4: Gruplardaki nitrotirozin düzeyleri

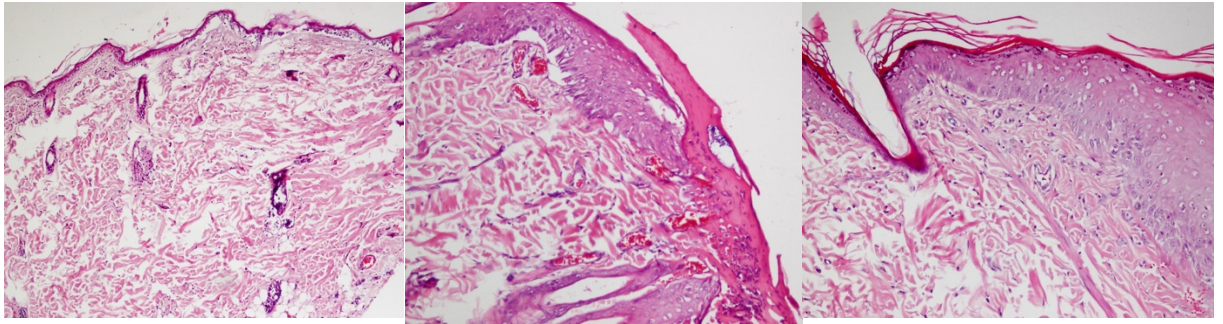
Grup 1a 'da 24 saatte elde edilen nitrotirozin değeri ortalaması $249.47(\pm 24.42)$ ng/ml, grup 2a'da $245.55(\pm 22.01)$ ng/ml ve grup 3a'da $239.03(\pm 24.79)$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir($p:0.682$).

Grup 1b 'da 7. günde elde edilen nitrotirozin değeri ortalaması $228.77(\pm 40.09)$ ng/ml, grup 2b'de $199.33(\pm 28.92)$ ng/ml ve grup 3b'de $194.31(\pm 22.32)$ ng/ml olarak ölçülmüştür. Gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilememiştir($p:0.164$).

Her deney ve tedavi grubunda 24. saat ve 7. günde elde edilen nitrotirozin deęerleri kendi aralarında karřılařtırıldıęında ise Grup1a ile grup 1b arasında istatistiksel olarak fark tespit edilmemiřtir($p:0.253$). Nitrotirozin deęerinin Grup2b'de grup 2a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak řekilde daha dūřuk olduęu($p:0.01$), Grup 3b'de grup 3a'dan istatistiksel olarak anlamlı olacak řekilde daha dūřuk olduęu tespit edilmiřtir($p:0.005$) (Tablo 2)(řekil 4).

Histolojik Bulgular

Yanık uygulamasından 1 gūn sonra HE boyalı preparatlarda yanık alanlar dejenere ve dōkūlmūř epitelin varlıęı ile staz zonundan ayrılmaktaydı. Yanıęa baęlı olarak epitel altı baę dokusunda yer yer kanama odakları gōzlenmekle birlikte bunların DMSO ve tedavi gruplarında da varlıęı tespit edildi. Yanık uygulamasından 7 gūn sonra reepitelizasyon tūm gruplarda gōzlendi ve gruplar arasında epitel kalınlıęı aęısından belirgin bir fark dikkati řekmedi (Resim 5). Gerek 1 gūnlūk gerekse 7 gūnlūk doku örneklerinde infiltrasyon gōzlenmedi.



Grup 1

Grup 2

Grup 3

Resim 5: 7. gūndeki histolojik gōrūnūm.Tūm gruplarda reepitelizasyonizlenmekte (HE boyama, x400 būyūtme)

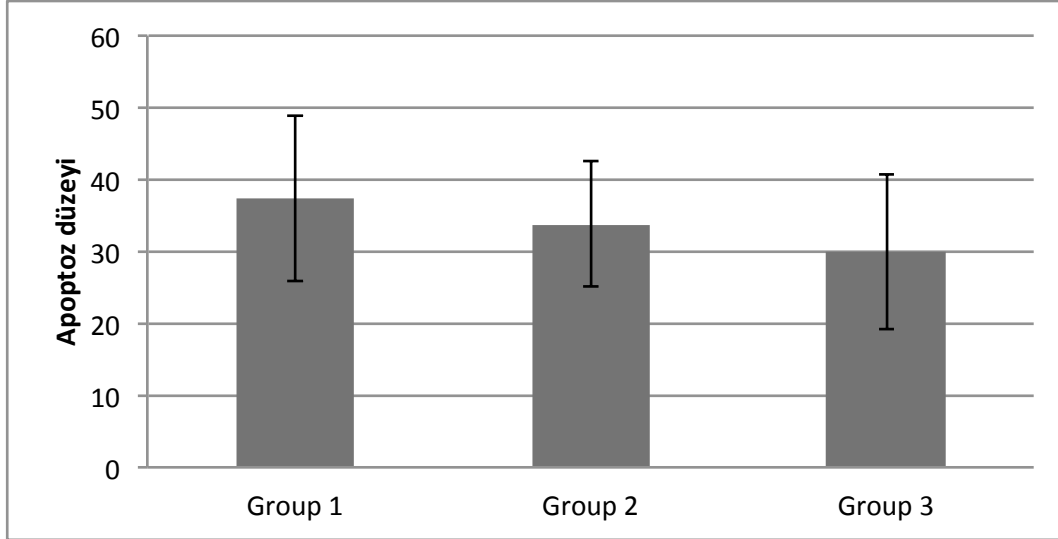
İmmunhistokimyasal Bulgular

Tablo 3: Gruplara göre 24.saatteki apoptoz ve otofaji düzeyleri

	Apoptoz	Otofaji
Grup 1	37.4±11.5 ^a	27.17±5.53 ^a
Grup 2	33.8±8.7 ^b	21.00±5.66 ^b
Grup 3	30.0±10.8 ^{a,b}	49.50±8.58 ^{a,b}
p-değeri	<0.001†	<0.001†

† One-Way ANOVA, a: Group 1 vs Group 3 (p<0.001), b: Group 2 vs Group 3 (p<0.001).

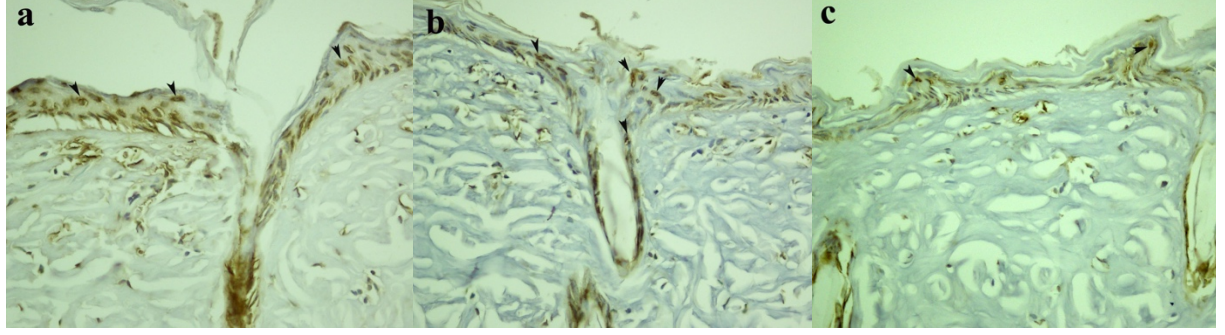
Apoptoz tayini



Şekil 5: Gruplardaki apoptoz düzeyleri

Yanık uygulamasından 24 saat sonra staz zonunda işaretlenen TUNEL pozitif hücre sayılarının deney gruplarındaki dağılımı Tablo 3 de gösterilmiştir. Apoptotik hücreler, başta yüzey epiteli olmak üzere kıl folikülü epitelinde tespit edildi. Grup 1a' da tespit edilen apoptoz miktarı ortalaması 37,4(±11.5),, Grup 2a'da tespit edilen apoptoz miktarı ortalaması 33,8(±8.7) ve grup 3a'da tespit edilen apoptoz miktarı ortalaması 30(±10.8) olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak analiz yapıldığında grup 3a'deki

apoptoz miktarı, grup 1a ve grup 2a'dan istatistiksel olarak daha az olduğu ($p<0.01$), grup 2a'daki apoptoz miktarı ise grup 1a'dan istatistiksel olarak daha az olduğu tespit edilmiştir ($p<0.01$) (Tablo 3) (Resim 6) (Şekil 5).



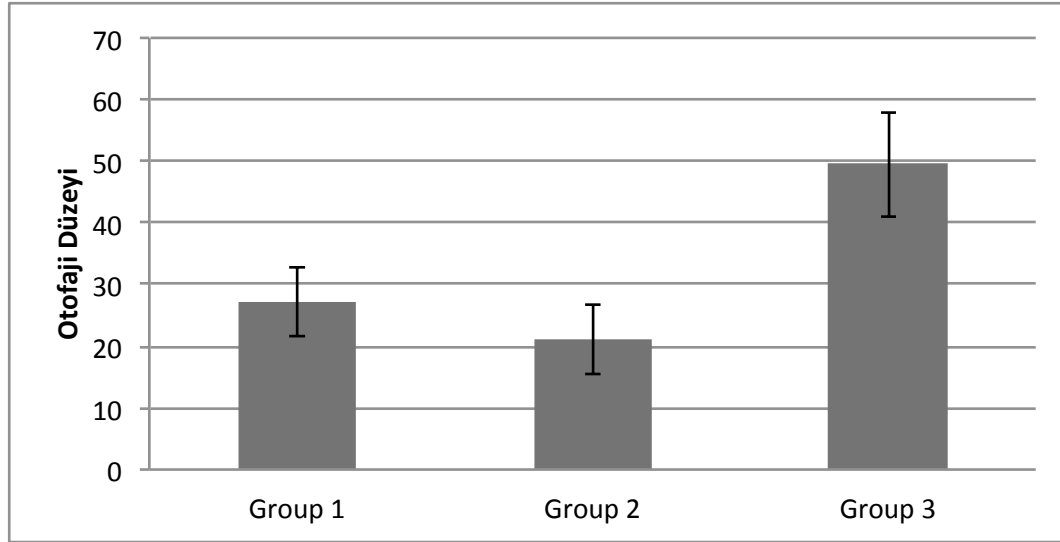
Grup 1

Grup 2

Grup 3

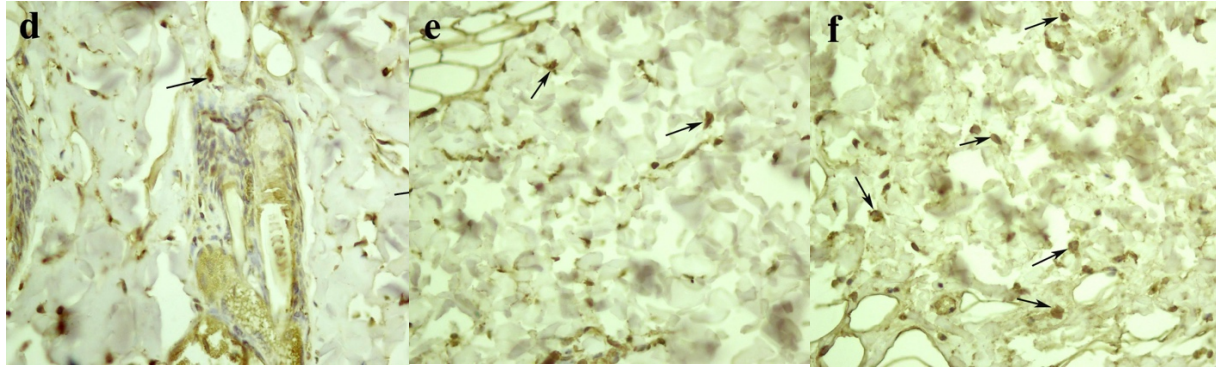
Resim 6: Gruplardaki apoptotik hücrelerin görünümü (TUNEL boyama x400 büyütme)

Otofaji tayini



Şekil 6: Gruplardaki otofaji seviyesi

Yanık uygulamasından 24 saat sonra, yanık derinin staz zonunda ve özellikle derin dermiste yerleşmiş otofajinin varlığını işaret eden Beklin pozitif hücreler, koyu kahverengi boyanmış sitoplazmaları ile ayırt edildi. Grup 1a' da tespit edilen otofaji miktarı ortalaması $21.00(\pm 5.66)$, Grup 2a'da tespit edilen otofaji miktarı ortalaması $27.17(\pm 5.53)$ ve grup 3a'da tespit edilen otofaji miktarı ortalaması $49.50(\pm 8.58)$ olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak analiz yapıldığında grup 3a'deki otofaji mikarı, grup 1a ve grup 2a'dan istatistiksel olarak daha fazla olduğu($p<0.01$), grup 2a'daki otofaji miktarı ise grup 1a'dan istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir($p<0.01$). (Tablo 3)(Resim 7)(Şekil 6).



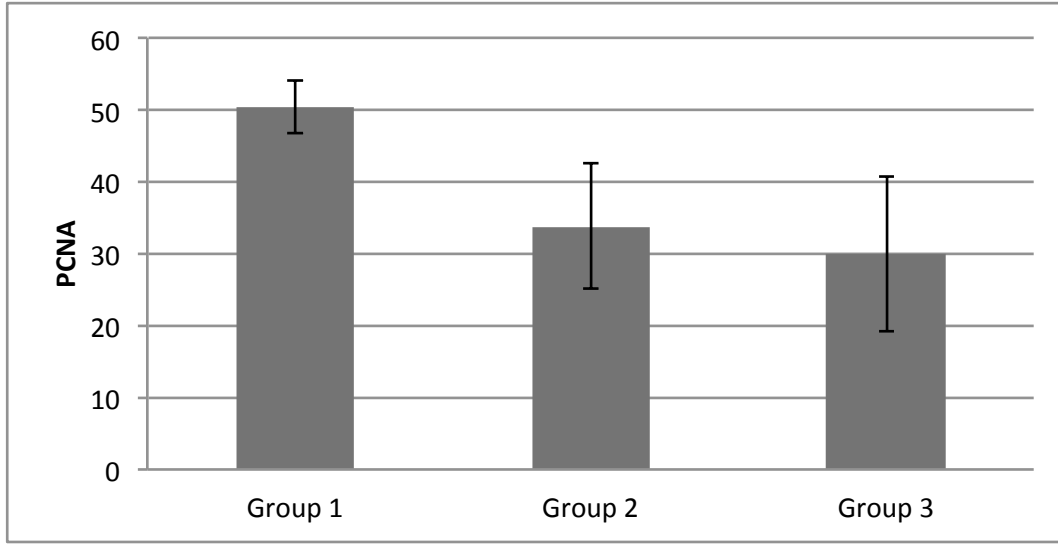
Grup 1

Grup 2

Gup 3

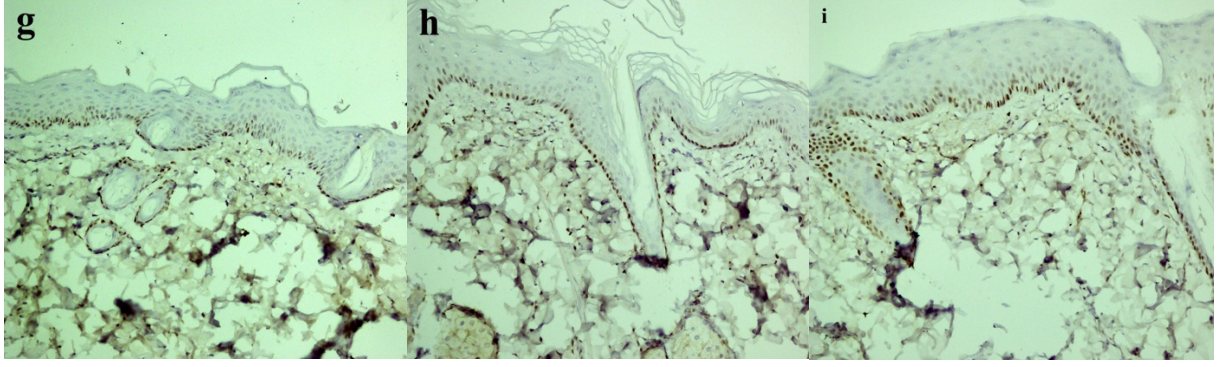
Resim 7: Graplardaki apoptotik hücrelerin görünümü (antibeklin boyama x400 büyütme)

Hücre proliferasyonu tayini



Şekil 7: Graplardaki PCNA seviyesi

Hücresel proliferasyonu tespit etmek amacıyla yaptığımız PCNA immün işaretleme sonuçları Tablo 1 de gösterilmiştir. Yanık uygulamasından 24 saat sonra elde edilen staz zonu deri örneklerinde herhangi bir PCNA pozitif hücreye rastlanmadı. 7 günde elde edilen staz zonu deri örneklerinde, graplarda epidermis ve kıl folikül epiteli olmak üzere tüm epitelde tespit edilen PCNA pozitif hücre sayısı ortalaması, Grup 1b' de 50.40(±3.65), Grup 2b'de 33.80(±8.70) ve grup 3b'de 30.00(±10.80) olarak hesaplanmıştır. İstatistiksel olarak analiz yapıldığında grup 1b'ye göre sırasıyla; Grup 2b ve Grup 3b'de ortalama PCNA istatistiksel anlamlı olarak daha düşüktü (p=0.019 ve p=0.008). Grup 2b ile Grup 3b arasında ise ortalama PCNA düzeyleri istatistiksel olarak fark yoktur (p=0.764).(Tablo 1)(Resim 8)(Şekil 7).



Grup 1

Grup 2

Grup 3

Resim 8: Gruplardaki proliferasyonun görünümü (PCNA boyama x400 büyütme)

TARTIŞMA

Çalışmamızda yanık staz zonü modeli olarak comn yanık modelini kullandık. Bu model ile defa Regas ve Ehrlich tarafınca tanımlanmış ve birçok çalışmada kullanılmış bir modeldir(Regas, 1992;Tan, 2013). Staz zonundaki değişimler tespit edilebilmesi ve elde edilen sonuçların daha önce bu model ile yapılan çalışmaların sonuçları ile karşılaştırılabilmesi için bu model seçilmiştir.

Yapılan çalışmalarda yanık staz zonundaki dokuların kurtarılabilmesi ve yanık nekrozunun ilerlemesinin durdurulabilmesi için gerekli tedavi ve girişimlerin, yanık sonrası ilk 48 saatte yapılması gerektiği göstermiştir(Tan, 2013?). Çalışmamızda kersetinin tedavisi ile yanık staz zonunda doku hasarının ilerlemesinin azaltılması amaçlanmış ve kersetinin özellikle yanık sonrası ilk 24 saatte, staz zonü dokularında oluşturduğu etkiler gösterilmiştir.

Yanık sonrası, yanık staz bölgesindeki dokularda termal enerjiye maruziyet sonrası inflamasyon oluşmakta vasküler geçirgenlik artmakta ve doku ödemi görülmektedir. Bu inflamasyon sırasında ortamda toplanan nötrofillerden sitotoksik sitokinler ve serbest oksijen radikalleri(ROS) salınmaktadır. Yanıkta inflamasyonun uzaması nedeniyle ortamdaki aşırı miktarda biriken sitokin ve ROS'ları antioksidan mekanizmalar dengeleyememekte ve bunun sonucunda da lipid, protein ve nukleik asid gibi vital yapılarda hasarlanma olmaktadır(Shupp, 2010). İnflamasyon sırasından nötrofillerin postkapiller venüllerde aşırı toplanması damarlarda tıkanmaya neden olmakta ve dokuların perfüzyonu azalmaktadır. (Gravante, 2006;Singer, 2006). Bu değişimler staz zonundaki dokuların iskemi oluşması ve hücreler ölmesine neden olan etmenlerdendir(Eski, 2011).

Çalışmamız sonucunda kronik kersetin tedavisi ile daha fazla olmak üzere, kersetin tedavisinin yanık staz zonundaki doku yaşayabilirliğini kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde arttırdığı makroskopik olarak yaşayan doku miktarının hesaplanması ve immunhistokimyasal olarak PCNA ile hücre proliferasyonunun hesaplanması ve sintigrafik inceleme ile gösterilmiştir.

Kersetinin antiinflamatuvar etkinlik ile ilgili birçok çalışma yapılmıştır. Vicentini ve ark (Vicentini, 2011) yaptıkları çalışmada kersetinin insan keratinositlerinde, UVB iridasyon sonrası IL-1beta, IL-6,IL-8 ve tümör nekroz faktörü(TNF) alfa ekspresyonunu baskıladığı, Casagrande ve ark(Casagrande, 2006) ise yaptıkları çalışmada topikal kersetin uygulamasının fare derisinde UVB- iridasyonu sonucu oluşan MPO miktarını azalttığı göstermişlerdir. Fuhrman ve arkadaşları(Fuhrman, 1995), kersetinin, $O_2^{\bullet-}$ ve $\bullet OH$ radikalleri nedeni ile hücrelerde oluşan lipid

peroksidasyonu oluşumunu azalttığını, Moroney ve ark(Moroney, 1988),, siklooksijenaz ve lipooksijenaz enzim fonksiyonlarını inhibe ettiğini, Formica ve Regelson (Formica, 1995) ise kersetinin demir gibi geçişli metal iyonlarını şelate ettiğini yaptıkları alışamalarda göstermişlerdir. Kersetin ayrıca inflamatuvar sitokinlerin üretilmesinden sorumluk olan NF-κB yolağının insan keratinositlerinde üretimini engellenmektedir (Vicentini, 2011). Bu mekanizmalar ile kersetin antiinflamatuvar etki göstermektedir.

Kersetin antioksidan etkisi olduğu da bilinmektedir. Kersetin ROS oluşumunu engelleyerek ve ROS'lara karşı radikal temizleyici aktivite göstererek antioksidan etki yapmaktadır (Yin, 2013). Bu fonksiyonlara ek olarak kersetin antioksidan enzim oluşumu da arttırmaktadır. Çeşitli çalışmalarda kersetin ve metabolitleri tedavisi ile GSH, SOD, katalaz, GSH aktivitesinin arttığı gösterilmişlerdir (Erden, 2000; Yin, 2013;Skaper, 1997).

Çalışmamızda yanık staz zonunda oluşan inflamasyonun değerlendirilmesi ve akut ve kronik kersetin tedavisinin inflamasyonda üzerindeki etkisinin değerlendirilmesi için MPO, meydana gelmesi beklenen oksidatif hasar ve antioksidan savunma sisteminin değerlendirilmesi amacıyla malondialdehit (MDA) ve nitrotirozin ölçümleri kontrol grubu, akut ve kronik kersetin deney gruplarında 24. saatte ve 7. günde tenazi yapılan deneklerden alınan staz zonu doku örneklerinde ELİSA kitleri kullanılarak ölçülmüştür.

MDA lipid oksidasyonu ile prostoglandin ve tromboksan sentezi sonrası oluşan bir proteindir. ROS 'arın majör hedefi hücresel fosfolipidlerin uzun zincirli poliansatura

yağ asitleridir. Lipid peroksidasyonu sonucu toksik aldehyitler oluşmaktadır ve bunlardan biri de MDA dır(Deniz, 2013). MDA lipid peroksidasyonu ve oksidatif stres indikatörü olarak kullanılmaktadır. Çalışmamızda kontrol, akut kersetin ve kronik kersertin gruplarından MDA değerleri karşılaştırıldığında, 24. saatte ve 7. günde yapılan ölçümlerde tespit edilen MDA seviyesi grup 3'de en az, grup 1 de ise en fazla olduğu tespit edilmiştir fakat 24. saatte ve 7. günde ölçülen değerler gruplar arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak fark tespit edilememiştir. Kontrol grubu ve tedavi gruplarında, her grubun kendi içinde 24. saatteki ve 7. gündeki değerleri karşılaştırıldığında, 7. gündeki MDA değeri, 24. saatteki değerine göre istatistiksel olarak daha fazla olduğu tespit edilmiştir. Yanık sonrası MDA'nın ilk 24 saatte hızlı olarak yükseldiği, 24.saatten sonra daha yavaş olsa da yükselmeye devam ettiği daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir (Guo, 2015). Çalışmamızda da her grupta MDA seviyesinin 7. günde 24. saatteki değerinde daha yüksel olduğu tespit edilmiştir. Kersertin tedavi ile bu yükselmede azalma olsa da bu yükselme kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olmamıştır. Deniz ve ark (2013) N-acetylcstein in yanık staz zonu üzerindeki etkisi üzerinde yaptığı çalışmada da N-acetylcstein yanık staz zonunda doku nekrozunu azaltsa da, bizim çalışmamızda benzer şekilde, MDA seviyesi üzerinde bir fark oluşmadığını gösterilmiştir(Deniz, 2013).

MPO polimorfonuklear nötrofil lökoistler (PMNL) fonkliyonu ve aktivitesini gösteren bir belirteçtir ve yanık rat derisinde ELISA ile tespit edilebilmektedir. Çalışmamızda kontrol, akut kersetin ve kronik kuersertin gruplarından MPO değerleri karşılaştırıldığında, 24. saatte ve 7. günde yapılan ölçümlerde tespit edilen MPO seviyesi grup 3'de en az, grup 1'de ise en fazla olduğu tespit edilmiştir fakat 24. saatte ve 7. günde ölçülen değerler gruplar arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak fark tespit edilememiştir. Aynı deney ve tedavi grubunda ise 24. saat

ve 7. günlerde alınan doku örnekleri karşılaştırıldığında ise MPO değerinin 7. Günde istatistiksel olarak daha az olduğu tespit edilmiştir. Staz zonunda yanık sonrası 24. Saatte MPO en yüksek seviyeye ulaşmakta ve 48 saat içinde azalmaya başlamaktadır(Guo, 2015). Çalışmamızda da 24. saatten sonra MPO değeri azalmıştır ayrıca kersetin tedavisi ile 24. saatte de 7. sünde de kontrol grubuna göre daha az MPO oluştuğu tespit edilmiştir fakat bu azalma istatistiksel olarak anlamlı bulunmamıştır.

Bir serbest radikal olan nitrik oksid (NO), nitrik oksid sentaz(NOS) enzimi aracılığı ile L-arjininden oluşmaktadır. NO, askuler tonusun regülasyonunda çok etkili bir vazodilatatör ajandır. Yanık travması sonrası yanık dokusundan ve kanda NO miktarının arttığı gösterilmiştir ve bu durum NO'in yanık patofizyolojisinde fonksiyonu olduğunu düşündürmektedir. NO'in vasoaktif fonksiyonu guanilat siklaz ile direkt ilişkisine bağlıdır fakat NO eğer lökosit kaynaklı serbest oksijen ile birleşirse perosinitriti oluşturmaktadır. Peroksinitrit çok toksik olan ve birçok biyomolekülde hasar oluşturan bir oksidanttır. Peroksinitrit, tirozin'in nitrasyonuna neden olmakta ve nitrotirozin ortaya çıkmaktadır. Nitrotirozin, peroksinitrat ölçümü için biomarker olarak kullanılan bir proteindir (Rawlingson,2010; Lange ,2011).

Çalışmamızda kontrol, akut kersetin ve kronik kuersertin gruplarından nitrotirozin değerleri karşılaştırıldığında, 24. saatte ve 7. günde yapılan ölçümlerde tespit edilen nitrotirozin seviyesi grup 3'de en az, grup 1'de ise en fazla olduğu tespit edilmiştir fakat 24. saatte ve 7. günde ölçülen değerler gruplar arasında karşılaştırıldığında, istatistiksel olarak fark tespit edilememiştir. Aynı deney ve tedavi grubunda ise 24. saat ve 7. günlerde alınan doku örnekleri karşılaştırıldığında ise nitrotirozin değerinin 7.

Günde istatistiksel olarak daha az olduğu tespit edilmiştir.

Çalışmamızda da kersetin tedavisi ile MDA, MPO ve nitrotirozin seviyelerin azaldığı görülmüştür fakat gruplar arasındaki farkların istatistiksek olarak anlamlı olmadığı tespit edilmiştir. Kersertin DMSO içinde çözülerek uygulanmış olup DMSO'nun kendisinin de antioksidan ve antiinflamatuvar etkinlik ile deride iskemi reperfuzyon hasarının engellediği gösterilmiştir(van den Heuvel MG 2009). Bu nedenle DMSO ve kersetinin birlikte antioksidan ve antiinflamatuvar etkinlikleri ölçülmüş olup, kontrol grubunda da DMSO nedeni ile bu etkinlik olmuştur. Gruplar arasında fark olmaması nedeni DMSO ve kersertinin kümülatif etkilerinin tespit edilmiş olması olabilir. İkinci bir neden deri dokusu homojenizasyonu zordur ve ELİSA ile yanlış sonuçlar elde edilebilmektedir. Proje bütçesinde sınırlılık nedeni ile western blot analiz yerine ELISA yapılmıştır. Teknik nedenlerle yanlış sonuçlar elde edilmiş olabilir.

Yanık sonrası staz sonunda oluşan iskemi sonrası hücre ölümü histolojik olarak 3 şekilde oluşur. Bunlardan birincisi pasif ve kontrolsüz hücre ölümü olan nekroz ikincisi ise programlanmış hücre ölümü olan apoptozdur. 3. yol ise yanık staz zonunda tip 2 apoptoz olarak sınıflanan otofajidir. Yapılan çalışmalarda staz bölgesinde ilk 24 saate otofaji olduğu, ilk 48 saatte de apoptozun yoğun şekilde olduğu, 48 saaten sonra ise nekrozun daha yoğun olarak olduğu görülmüştür.(Singer, 2008;Tan, 2013).

Apoptoz, programlanmış hücre ölümü tiplerinden biridir. Hücresel apoptoz; patogeneze karşı savaşılmaması ve inflamatuvar hücrelerin ortamdaki uzaklaşması ile homeostazın sağlanması, hücrelerin gelişmesi ve farklılaşması için önemli bir role sahip (Opferman 2003) olsa da iskemi durumundan apoptoz doku hasarını

arttırabilmektedir. Myokardial iskemi modellerinde hücrel apoptoz iskemik hasarlanması agreve ettiği, apoptozun azaltılması ise iskemik yaralanmayı azalttığı gösterilmiştir(Hochhauser, 2003).

Apoptozun yanık üzerindeki etkisi değişik çalışmalarda gösterilmiştir. Iwasaki ve ark (Iwasaki, 1997). rat modelinde termal yaralanmanın DNA üzerindeki etkisi incelemiştir. 85 derecedeki sıcak suya ile derinin 5 saniye temas ettirilmesi apoptoz göstergesi olarak nukleosondaki DNA fragmentasyonuna neden olmuştur. Bu tip bir hasar aynı zamanda tipik koagulasyon nekrozu görüntüsü oluşturmaktadır. Bundan farklı olarak 65 derece sıcak su ile 10 saniye derinin teması ile ise DNA fragmentasyonu veya deri nekrozu oluşmamaktadır. Gravante ve ark (Gravante, 2006) kısmı kalınlıkta deri yanığı olan 20 hastadan yanık sonrası 3 ile 13 günler arası deri biyopsisi almışlardır. Bu alışma sonucunda dermis ve kutanöz katlantılarda TUNEL pozitif apoptotik hücreler olduğunu tespit etmişlerdir. Gravante ve ark (Gravante, 2007) yaptıkları başka bir çalışmada kısmı kalınlıkta yanık alanındaki deri ile normal derideki apoptoz oranlarını karşılaştırmışlar ve yanıkta apoptozun istatistiksel olarak daha fazla olduğunu göstermişlerdir. Vernez ve ark (Vernez, 2013) ileri derecede yanığı olan 37 hastanın yanık derisinden elde ettikleri derilerden elde edilen kùltüre epidermal otograflarda hücrelerde %90'ın üzerinde yaşayabilirlik ve %6'nın altında apoptoz olduğunu göstermişlerdir.

Staz zonunda, yanık sonrası 30. dakikadan itibaren başlayarak yanıktan 48 saat sonrasına kadar epidermis, dermiş, kıl follükùlleri, sebase bezlerde apoptoz tespit edilebilmektedir fakat hücreleri az bir kısmında apoptoz olduğu görùlmüřtür. Bu durum staz bölgesinde ilerleyici nekroz oluşmasında apoptozun etkisi olduğunu şeklinde

yorumlanmaktadır(Singer, 2008).

Apoptozun engellenmesi ile yanık yarasının ilerlemesinin durması konusunda da birçok çalışma yapılmıştır. İnflamatuar cevabın ve apoptozun uyarıcısı olan p38 mitogen-activated protein kinase (p38MAPK)'ın inhibitörün topikal uygulanmasının %30 dan fazla yanığı olan hayvanlarda inflamatuvar cevabın ve kıl folliküllerinde apoptozu azalttığı göstermiştir(Ipaktchi, 2006).

Staz zonundaki kısmı kalınlıktaki derinin tam kalınlıkta deri haline gelmesi nedeni olarak termal enerji sonrası oluşan dokularda oluşan apoptoz olabilir. P38MAPK hücrelerde, ekstrenal stress ve yaralanmaya cevapta önemli bir fonksiyonu vardır.İnsan keratinositlerinde p38MAPK aktivasyonu p53 gibi proapoptotik transkripsiyon faktörlerinin downstream aktivasyonu ile sonuçlanır ve interlökin-6(IL-6), IL-1b ve tumor nekroz faktör alfa(TNF-a) gibi proinflamatuvar sitokinlerin oluşmasını stimule eder(Dillman JF III, 2004). Diğer çalışmalar p38MAPK 'ın ısı, ultraviyole radyasyon, değişik tip organik toksinler nedenleri ile oluşan dermal inflamasyon ve apoptotik cevabı gösterilmiştir(Huang, 1999). İleri derecede apoptoz diğer organ sistemlerinde de hücrel apoptozu indüklemektedir. Jeschke ve ark termal yaralanma sonrası bağırsak hücrelerinde apoptoz olduğunu göstermiştir (Jeschke, 2005).

Birçok çalışma apoptozun kısmı kalınlıktaki yanık hasarının tam kalınlıktaki hasara ilerleme sebebi olarak göstermiştir ve comb burn modelindeli yanık staz zonunda apoptotik hücrelerin bulunması bu bulguyu desteklemektedir. Bu apoptotik hücreler zaman içinde nekrotik hücreler haline gelmektedir(Singer, 2008).

Çalışmamızda apoptoz tayini DNA fragmentasyonunun tespit edilmesi ve hücrelerin apoptoza uğradığının tespit edilmesi için kullanılan bir yöntem olan Transferase-mediated dUTP nickend labeling (TUNEL) boyama ile yapılmıştır(Tan, 2013).Çalışmamızda kersetinin kronik uygulanması ile daha fazla olmak üzere kersetin tedavisi ile 24. saatte apoptozun daha az olduğu tespit edilmiştir ve apoptozun daha az olan gruplardaki staz zonunda 7. gün ölçülen nekroz miktarının da daha az olduğu tespit edilmiştir. Bizim sonuçlarımız ve daha önce yapılan çalışmaların sonuçlarına uygun olarak yanık sonrası apoptoz oluşumunu hakkında benzer sonuçlar ortaya koymuştur ve yanık staz zonunda apoptozun engellenmesi doku hasarını azaltmakta ve yara iyileşmesini arttırmaktadır(Guo,2015). Çalışmamızda da kersetinin apoptozu engelleyerek bu ilerlemeyi azaltmıştır.

Kersetini apoptoz üzerindeki etkisi hücre tipine göre değişmektedir. Kersetinin temel özelliklerinden biri antikanser etkinliğidir. Kersetinin lösemik hücreler, pankreatik tümör hücreleri, meme kanseri hücreleri, hepatoma hücreleri ve prostat kanseri hücrelerini, mide kanseri hücrelerine karşı anti kanser etkinliği olduğu gösterilmiştir (Wang, 2012). Bu antikanser etkinlik, kanser hücreleri üzerinde apoptotik etki göstermesi ve kanser hücrelerinin antikanser ilaçlara olan duyarlılığı artırması ile olmaktadır (Lee, 2015).

Kanser hücreleri üzerinde olan bu proapoptotik etkinliğinin tersi olarak kersetinin ve derivelerini, kerstinositlerde UVA ve ROS lara bağlı olarak oluşan apoptozu engellediği gösterilmiştir (Yin, 2013; Lee,2015). Kersetin analogu olan kuersitrin tedavisini UVB bağlı c-caspase-3, c-PARP-1 eksresyonunu azaltarak apoptoz oluşumunu azaltmaktadır(Yin, 2013). Nuclear factor (NF)-κB immun cevap, inflamatuvar hücreler,

hücre proliferasyonu ve apoptozdaki gerekli genlerin transkripsiyonunu regule eden bir proteindir (Yamamoto, 2008). Bir tümör baskılama proteini olan p53 de DNA hasarı, oksidatif stres, BAX aktivasyonu gibi nedenlerle oluşan apoptozu regüle eder(Roshanzamir, 2014). p53 ısı gibi ekstrenal travmalar sonrası da aktive olarak apoptozu indüklemektedir(Singer, 2008). Kersetinin insan keratinositlerinde NF- κ B pathway ve p 53 üretimini baskılayarak keratinositler üzerinde antiapoptotik etkinlik göstermektedir(Roshanzamir, 2014).

Otofaji intraselüler makromolekül artıklarının lizozomlara taşınması ve burada amoniasitler gibi biyolojik olarak aktif monomerlere yıkılmalarının sağlanması ve bu sayede hücresel metabolik turnover ve homeostasis in sağlanması prosesidir. Otofaji bazı yönlerden apoptoz ile ilişkidir fakat yanık yarasında patogenezinde yeri kesin olarak bilinmemektedir(Xiao, 2014).

Otofaji temel olarak enfeksiyon, kanser, nörodejeneratif hastalıklar, yaşlanma, kalp hastalıkları gibi patolojik durumla organları korumaktadır. Otofaji oluşmasındaki defekt, nörodejeneratif hastalıklar, kardiomyopati, diyabet, karaciğer hastalıkları ve Crohn hastalığı gibi hastalıklarla doğrudan ilgilidir. Otofaji aktivasyonunun kalp kasını ve nöronları iskemi reperfüzyon hasarından koruduğu gösterilmiştir(Xiao, 2014).

Otofaji ve yanık yarası progreyonu arasındaki ilişki konusunda Xiao ve ark (Xiao, 2014) yaptıkları çalışmada yanık staz zonunda, yanık sonrası ilk 24 saatte otofajinin normal deriye göre anlamlı şekilde azaldığı, 24. saatten sonra artmaya başladığı ama 72. saatte bile normal deriden daha az olduğunu göstermişlerdir. Yanık sonrası ilk 24 saatte staz zonundaki iskemi ve inflamasyon otofajiyi aktive etmekte ve otofaji hücre koruyucu etki göstermektedir. Yanık sonrası 48 ile 72 saat arasında, otofajini

artmasına paralel olarak, doku perfuzyonu düzelmekte ve inflamasyon azalmaktadır ve bu durum bu yanık modelinde otofajinin prosurvival rolü olduğunu göstermektedir. Apoptoz, otofaji ile değişik yollardan birbirleri ile bağlantılıdır. Otofajinin hücre ve dokuları apoptoz ve inflamasyondan koruduğunun gösterilmesi gibi(Zou, 2013),otofajinin apoptotik hücre ölümünü uyardığının gösterildiği yayınlar da mevcuttur(Nezis, 2010). Otofaji ve apoptoz bazı dokularda beraber olabilirler ve hatta aynı hücrede görülebilirler. Apoptoz otofaji ile başlayabilir ve otofaji apoptoz ile sonlanabilir(Xiao, 2014).

Staz zonunda da otofajiyi indükleyen iskemi ve inflamasyon aynı yoğunlukta devam eder ise otofaji, apoptozu uyarabilmekte ve doku ölümü görülebilmektedir(Thome, 2009). Özetle otofajinin yanık yarasında hücre koruyucu(prosurvival) ve hücre öldürücü(prodeath) etkinliği olabilmektedir.

Çalışmamızda etkinliğini incelediğimiz kersetinin otofajiyi indüklediği değişik çalışmalarda gösterilmiştir(Pallauf, 2013) ve kersetin tarafınca otofajinin uyarılması hücrelerin kersetin tarafınca uyarılan apoptozdan korunması için bir girişim gibi görünmektedir(Wang, 2011). Kersetinin otofaji indüksiyonu yapıcı etkisinin mekanizması olarak değişik hücresel hedeflere etki etmesi öne sürülmektedir. Kersetin, sirtuins (Howitz, 2003) ve ROS oluşumu düzenleyerek (Mertens-Talcott, 2005), Jnk1/2 ve Mek/Erk (Nguyen, 2004) yollarını uyararak otofaji regülasyonuna yapabilmektedir. Çoğu verinin tersine kersetinin otofajiyi inhibe ettiğine dair yayın da mevcuttur . Kersetinin PI3Ks ve NFkappaB inhibe etmektedir. PI3Ks ve NFkappaB

otofaji regölasyonu ve inhibisyonunda etkileri vardır(Pallauf, 2013) bu nedenle kersetin otofajiyi inhibe de edebilmektedir

Katabolik stres durumdan hücrel homeostasis düzenlenmesindeki bir yolak olan mTOR yolağı otofajiyi ve protein sentezini kontrol etmektedir(Klappan, 2012). Rapamycin memelilerde, mammalian target of rapamycin (mTOR) kinaz aktivitesini inhibe etmekte ve bu şekilde otofajiyi uyarmaktadır. Rapamycin tedavisi ile ratlarda yanık staz zonunda otofajinin ve epitelizasyonu arttırdığı gösterilmiştir(Xiao, 2013). mTOR yolağının Rapamycin gibi kersetin tarafınca da inhibe edilmektedir. Kersertin tedavisi ile MCF7 , HeLa , and MDA-MB-453 hücre kültürlerinde mTOR sinyal yolağı inhibe olduğu ve bu yolla da otofajinin indüklendiğı gösterilmiştir(Klappan, 2012).Psahoulia ve ark (Psahoulia, 2007) yaptıkları çalışmada hepatositlerde kersetin tarafınca otojinin indüklendiğini göstermişlerdir. Çalışmamızda kronik kersetin tedavisinin otofajiyi arttırması mTOR kinaz aktivitesinin inhibe edilmesine bağlanabilmektedir.

Çalışmamız sonucunda kersetinin yanık staz zonunda doku yaşayabilirliğini arttırdığı ne nekroz miktarını azalttığı, makroskopik, PCNA ile immunohistokimyasal ve sintigrafik olarak tespit edilmiştir. Daha önceki çalışmalarda kersetinin özellikle keratinositler üzerinde antiinflamatuvar, antioksidan, antiapoptotik ve otofaji indüleyici etkisi gösterilmiştir. Çalışma sonuçlarımızda da istatistiksel olarak anlamlı olmasa da kersetinin MDA, MPO ve nitrotirozin değerlerini düşürerek antioksidan ve antiinflamatuvar etki göstererek, apoptozu azaltarak ve otofajini arttırarak yanık staz zonunda doku yaşayabilirliğini arttırmıştır.

KAYNAKLAR

Casagrande R, Georgetti SR, Verri Jr WA, Dorta DJ, dos Santos AC, Fonseca MJ. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB induced oxidative stress in hairless mice. *J Photochem Photobiol B*, 3;84: 21–27, 2016.

Chen BL, Wang LT, Huang KH, Wang CC, Chiang CK, Liu SH. Quercetin attenuates renal ischemia/reperfusion injury via an activation of AMP-activated protein kinase-regulated autophagy pathway. *J Nutr Biochem*, 25;11:1226-34, 2014

Deniz M, Borman H, Seyhan T, Haberal M. An effective antioxidant drug on prevention of the necrosis of zone of stasis: N-acetylcysteine. *Burns*, 39;2:320-5, 2013.

Dillman JF III, McGary KL, Schlager JJ. An inhibitor of p38 MAP kinase downregulates cytokine release induced by sulfur mustard exposure in human epidermal keratinocytes. *Toxicol In Vitro*, 18;5:593–9,2014.

Erden Inal M, Kahraman A. The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet A induced oxidative stress in rats. *Toxicology*, 23;154: 21–29,2000.

Eski M, Ozer F, Firat C, Alhan D, Arslan N, Senturk T, Işik S. Cerium nitrate treatment prevents progressive tissue necrosis in the zone of stasis following burn. *Burns*, 38;2:283-9, 2012.

Fuhrman B, Lavy A, Aviram M. Consumption of red wine with meals reduces the susceptibility of human plasma and low-density lipoprotein to lipid peroxidation. *Am J Clin Nutr*, 61;3:549–554, 1995.

Gravante G, Filingeri V, Delogu D, Santeusano G, Palmieri MB, Esposito G, Montone A, Sconocchia G. Apoptotic cell death in deep partial thickness burns by coexpression analysis of TUNEL and Fas. *Surgery*, 139;6:854–5, 2006.

Gravante G, Palmieri MB, Esposito G, Delogu D, Santeusano G, Filingeri V, Montone A. Apoptotic cells are present in ischemic zones of deep partial-thickness burns. *J Burn Care Res*, 27;5:688-93, 2006.

Gravante G, Palmieri MB, Esposito G, Delogu D, Santeusano G, Filingeri V, Montone A. Apoptotic death in deep partial thickness burns vs. normal skin of burned patients. *J Surg Res*, 141(2):141–5, 2007

Grunwald TB, Garner WL. Acute burns. *Plast Reconstr Surg*, 121;5:311e–9e, 2008.

Guo SX, Jin YY, Fang Q, You CG, Wang XG, Hu XL, Han CM. Beneficial effects of hydrogen-rich saline on early burn-wound progression in rats. *PLoS One*, 13;10:e012489, 2015

Hochhauser E, Kivity S, Offen D, Maulik N, Otani H, Barhum Y, Pannet H, Shneyvays V, Shainberg A, Goldshtaub V, Tobar A, Vidne BA. Bax ablation protects against myocardial ischemia-reperfusion injury in transgenic mice. *Am J Physiol Heart Circ*

Physiol, 284;6:H2351–9,2003.

Howitz KT, Bitterman KJ, Cohen HY, Lamming DW, Lavu S, Wood JG, Zipkin RE, Chung P, Kisielewski A, Zhang LL, Scherer B, Sinclair DA. Small molecule activators of sirtuins extend *Saccharomyces cerevisiae* lifespan. *Nature*, 11;425:191–196, 2003.

Huang C, Ma WY, Maxiner A, Sun Y, Dong Z. p38 kinase mediates UV-induced phosphorylation of p53 protein at serine 389. *J Biol Chem*, 274;18: 12229–35,1999.

Iwasaki K, Izawa M, Mihara M. Thermal injury induces both necrosis and apoptosis in rat skin. *Br J Dermatol*, 137;4:647–8, 1997

Ipaktchi K , Mattar A, Niederbichler AD, Hoesel LM, Hemmila MR, Su GL, Remick DG, Wang SC, Arbabi S. Topical p38MAPK inhibition reduces dermal inflammation and epithelial apoptosis in burn wounds. *Shock*, 26;2:201–9,2006

Jackson Dm. The diagnosis of the depth of burning. *Br J Surg*, 40:588–96, 1953.

Jeschke MG, Bolder U, Finnerty CC, Przkora R, Müller U, Maihöfer R, Thompson JC, Wolf SE, Herndon DN. The effect of hepatocyte growth factor on gut mucosal apoptosis and proliferation, and cellular mediators after severe trauma. *Surgery*, 138;3:482–9,2005

Johnson RM, Richard R. Partial-thickness burns: identification and management. *Adv Skin Wound Care*, 16;4:178-87,2003

Kimura S, Warabi E, Yanagawa T, Ma D, Itoh K, Ishii Y, Kawachi Y, Ishii T. Essential role of Nrf2 in keratinocyte protection from UVA by quercetin. *Biochem Biophys Res Commun*, 387;1:109-14,2009.

Klappan AK, Hones S, Mylonas I, Brüning A. Proteasome inhibition by quercetin triggers macroautophagy and blocks mTOR activity. *Histochem Cell Biol*, 137;1:25-36, 2012.

Lange M, Szabo C, Enkhbaatar P, Connelly R, Horvath E, Hamahata A, Cox RA, Esechie A, Nakano Y, Traber LD, Herndon DN, Traber DL. Beneficial pulmonary effects of a metalloporphyrinic peroxynitrite decomposition catalyst in burn and smoke inhalation injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 300;2:L167-75,2011.

Lee DH, Nam YJ, Lee CS. Quercetin-3-O-(2"-galloyl)- α -L-rhamnopyranoside attenuates cholesterol oxidation product-induced apoptosis by suppressing NF- κ B-mediated cell death process in differentiated PC12 cells. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 388;8:869-81,2015.

Mertens-Talcott SU, Bomser JA, Romero C, Talcott ST, Percival SS. Ellagic acid potentiates the effect of quercetin on p21waf1/cip1, p53, and MAP-kinases without affecting intracellular generation of reactive oxygen species in vitro. *The Journal of Nutrition*, 135;3:609–614,2005.

Moroney MA, Alcaraz MJ, Forder RA, Carey F, Hoult JR. Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cyclo-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid

glycoside and related aglycone flavonoids. J Pharm. Pharmacol, 40;11: 787–792,1988.

Nezis IP, Shravage BV, Sagona AP, Johansen T, Baehrecke EH, Stenmark H. Autophagy as a trigger for cell death: autophagic degradation of inhibitor of apoptosis dBruce controls DNA fragmentation during late oogenesis in Drosophila. Autophagy, 6;8:1214–5,2010.

Nguyen TT, Tran E, Nguyen TH, Do PT, Huynh TH, Huynh H. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. Carcinogenesis, 25;5:647–659,2004.

Opferman JT, Korsmeyer SJ. Apoptosis in the development and maintenance of the immune system. Nature Immunol, 4;5:410–5,2003

Pallauf K, Rimbach G. Autophagy, polyphenols and healthy ageing. Ageing Res Rev, 12;1:237-52,2013

Psahoulia FH, Moumtzi S, Roberts ML, Sasazuki T, Shirasawa S, Pintzas A. Quercetin mediates preferential degradation of oncogenic Ras and causes autophagy in Ha-RAS-transformed human colon cells. Carcinogenesis, 28;5:1021–1031,2007

Rawlingson A, Greenacre SA, Brain SD. Generation of peroxynitrite in localised, moderate temperature burns. Burns. 2000 May;26(3):223-7.

Regas FC, Ehrlich HP. Elucidating the vascular response to burns with a new rat model. *J Trauma*, 32;5:557–63,1992

Roshanzamir F, Yazdanparast R. Quercetin attenuates cell apoptosis of oxidant-stressed SK-N MC cells while suppressing up-regulation of the defensive element, HIF-1 α . *Neuroscience*, 26;277:780-93,2014.

Singer AJ, McClain SA, Taira BR, Guerriero JL, Zong W. Apoptosis and necrosis in the ischemic zone adjacent to third degree burns. *Acad Emerg Med*. 2008 Jun;15(6):549-54.

Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner SM. The pathogenesis of burn wound conversion. *Ann Plast Surg*, 59;1:109–115,2007

Shakespeare, P. Burn wound healing and skin substitutes. *Burns*, 27;5:517–522,2001.

Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A review of the local pathophysiologic bases of burn wound progression. *J Burn Care Res*, 31;6:849-73,2010

Skaper, S.D., Fabris, M., Ferrari, V., Dalle Carbonare, M., Leon, A., 1997. Quercetin protects cutaneous tissue-associated cell types including sensory neurons from oxidative stress induced by glutathione depletion: cooperative effects of ascorbic acid. *Free Radic. Biol. Med.* 22, 669–678.

Tan JQ, Zhang HH, Lei ZJ, Ren P, Deng C, Li XY, Chen SZ. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. *Burns*, 39;8:1551-1556,2013.

Thome RG, Santos HB, Arantes FP, Domingos FF, Bazzoli N, Rizzo E. Dual roles for autophagy during follicular atresia in fish ovary. *Autophagy*,5;1:117–9,2009.

Uygur F, Evinç R, Urhan M, Celikoz B, Haholu A. Salvaging the zone of stasis by simvastatin: an experimental study in rats. *J Burn Care Res*,30;5:872–9,2009.

van den Heuvel MG, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RR. Review: Ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2009 Jun;62(6):721-6.

Vernez M, Raffoul W, Gailloud-Matthieu MC, Egloff D, Senechaud I, Panizzon RG, Benathan M. Quantitative assessment of cell viability and apoptosis in cultured epidermal autografts: application to burn therapy. *Int J Artif Organs*, 26;9:793–803,2003.

Vicentini FT, He T, Shao Y, Fonseca MJ, Verri Jr WA, Fisher GJ, Xu Y. Quercetin inhibits UV irradiation-induced inflammatory cytokine production in primary human keratinocytes by suppressing NF-kappaB pathway. *J Dermatol Sci*, 61;3:162–168,2011.

Wang K, Liu R, Li J, Mao J, Lei Y, Wu J, Zeng J, Zhang T, Wu H, Chen L, Huang C, Wei Y. Quercetin induces protective autophagy in gastric cancer cells: involvement of

Akt-mTOR- and hypoxia-induced factor 1 α mediated signaling. *Autophagy*, 7;9:966–978,2011

Wang P, Zhang K, Zhang Q, Mei J, Chen CJ, Feng ZZ, Yu DH. Effects of quercetin on the apoptosis of the human gastric carcinoma cells. *Toxicol In Vitro*. 2012 Mar;26(2):221-8.

Xiao M, Li L, Hu Q, Ma L, Liu L, Chu W, Zhang H. Rapamycin reduces burn wound progression by enhancing autophagy in deep second-degree burn in rats. *Wound Repair Regen*, 21;6:852-9,2013.

Xiao M, Li L, Li C, Zhang P, Hu Q, Ma L, Zhang H. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Acad Emerg Med*, 21;4:383-91,2014.

Yamamoto M, Takeda K. Role of nuclear I κ B proteins in the regulation of host immune responses. *J Infect*, 14;4:265–269,2008

Yin Y, Li W, Son YO, Sun L, Lu J, Kim D, Wang X, Yao H, Wang L, Pratheeshkumar P, Hitron AJ, Luo J, Gao N, Shi X, Zhang Z. Quercitrin protects skin from UVB-induced oxidative damage. *Toxicol Appl Pharmacol*, 269;2:89-99,2013.

Zou MH, Xie Z. Regulation of interplay between autophagy and apoptosis in the diabetic heart: new role of AMPK. *Autophagy*, 9;4:624–5,2013.