

GLOBAL SEREBRAL İSKEMİ SONRASI REPERFÜZYON HASARINI AZALTMADA FLAVONOİDLERİN ROLÜ

THE EFFECT OF FLAVONOIDS ON REDUCTION OF REPERFUSION INJURY AFTER GLOBAL CEREBRAL ISCHEMIA

Dr. Ali RAHMAN, Dr. Bilal ÜSTÜNDA¼, Dr. İbrahim Hanifi ÖZERCAN, Dr. Oktay BURMA,
Dr. Ahmet ÇEKİRDEKÇİ, Dr. M. Faik ÖZVEREN, Dr. İhsan Sami UYAR

Fırat Üniversitesi, Fırat Tıp Merkezi, Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Kliniği, ELAZI¼

Adres: Yrd. Doç. Dr. Ali RAHMAN, Fırat Üniversitesi, Fırat Tıp Merkezi, Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Kliniği, 23200 / ELAZI¼
e-mail: alirahman33@hotmail.com

Özet

Amaç:

Çalışma, dört damar oklüzyon metodu ile global serebral iskemiyi uygulanan ratlarda gerçekleştirildi. Çalışmanın amacı iskemik dokularda reperfüzyon sonrası gelişen hasarı önlemede flavonoidlerin etkisini araştırmaktır. Yöntem:

Grup 1 (kontrol grubu), grup 2 (iskemi-reperfüzyon grubu), grup 3 (tedavi sonrası iskemiyi-reperfüzyon grubu) olmak üzere üç grup oluşturuldu. Tüm gruplarda işlem sonrası elde edilen beyin dokularında malonyldialdehid ve glutatyon peroksidaz aktivite seviyeleri ile histopatolojik olarak hücre yapıları değerlendirildi.

Bulgular:

Malonyldialdehid (MDA) düzeyleri kontrol grubuna göre grup 2'de anlamlı olarak ($p<0.01$) artarken grup 3'teki artış anlamlı değildi. Glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri grup 2'de anlamlı olarak azalmıştı ($p<0.01$). Histopatolojik olarak da grup 3'de hücrelerin daha iyi korunduğu görüldü.

Sonuç:

Elde ettiğimiz bulgular flavonoidlerin reperfüzyon sonrası lipid peroksidasyonunu azaltmada etkili olduğunu düşündürmektedir.

Anahtar Kelimeler: Global serebral iskemiyi, reperfüzyon, flavonoid

Summary

Purpose:

This study was carried out in rats applied global cerebral ischemia, using four vessels occlusion method. The aim of the study was to investigate the effect of flavonoids to prevent the injury after reperfusion in ischemic tissue. Materials and methods:

Three groups were constituted as the group 1 (control group), the group 2 (ischemia-reperfusion group) and the group 3 (ischemia-reperfusion after flavanoid treatment). In all the groups, malonyldialdehyde and glutathion peroxidase activity levels and histopathologically cellular structures were evaluated in cerebral tissues obtained after procedure.

RESULTS: While malonyldialdehyde levels significantly increased in the group 2 compared to the controls, the increase in the group 3 was not significant. GSH-Px activity levels were significantly increased in the group 2 ($p<0.01$). It was shown that the cells were histopathologically protected in the group 3.

Conclusion:

Our findings concluded that flavonoids were effective to diminish lipid peroxidation after reperfusion

Keywords: Global cerebral ischemia, reperfusion, flavonoid

Giriş

İskemiyi reperfüzyon hasarı pek çok cerrahi girişim sonrası karşılaşılan ve dokuda destruksiyon oluşturan ciddi bir durumdur [1]. İskemiyi sonrası esas hedef reperfüzyonun sağlanması iken bu durum her zaman için olumlu sonuçlar doğurmamakta aksine reperfüzyonun başlaması doku injurisini indükleyebilmektedir [2].

İskemiyi, reperfüzyon ve no-reflow fenomeni cerrahi sırasında doku hasarının potansiyel kaynaklarıdır [3]. Arkus aorta anevrizmalarının tamiri serebral dolaşımın geçici süre kesilmesini içeren girişimlerle mümkün olabilmektedir. Ancak, merkezi sinir sistemi anoxia'ya oldukça duyarlı olduğu için bu ameliyatlardan sonrası oluşabilecek nörolojik hasar en korkulan komplikasyonlardır [4]. Bu esnada oluşan global serebral iskemiden beyini korumak amacıyla; hipotermik arrest, selektif serebral perfüzyon ve retrograd serebral perfüzyon gibi stratejiler geliştirilmiştir [5, 6]. Ancak dolaşımın yeniden sağlanması da injuriyi artırabilmektedir. Hücre injurisine eşlik eden temel mekanizma serbest oksijen radikallerine bağlı lipid peroksidasyonudur ve bu olay poliansatüre yağ asitleri ile fosfolidlerden oluşan hücre membranını dekompose eder [7]. Serebral korumayı artırmak amacıyla E vitamini, C vitamini benzeri çeşitli farmakolojik ajanlar kullanılmaktadır [8].

Günümüzde kapiller duvar frajilitelerini azaltmak amacıyla kullanılan flavanoidlerin serbest radikallere bağlı hasarları azaltmada etkili olabildiklerine dair yayınlar mevcuttur [9]. Biz de deneysel global serebral iskemiyi-reperfüzyon modelinde oluşan hasarı ve bu hasarı önlemede flavanoidlerin etkisini biokimyasal ve histo-patolojik olarak araştırdık.

Materyal ve Metod

Çalışma, etik kurul onayı alındıktan sonra 230-270 gr ağırlığındaki toplam 32 Winstar cinsi ratla yapıldı. Tüm aşamalarda "The guide for the care and use of laboratory animals (NIH publications No:86-23, revised 1985)" prensiplerine uyuldu. Ratlar üç gruba ayrıldı:

Grup 1 (n=10): Sham-operated grup (Kontrol) :
Sadece anestezi ve insizyon uygulandı.

Grup 2 (n=10): İskemi reperfüzyon grubu (İ / R)

Grup 3 (n=12): Tedavi + İ / R grubu : Bir hafta süreyle gastrik yolla 100 mg/kg/gün dozunda flavonoid içeren (Daflon, Servier) tedavi sonrası iskemi reperfüzyon uygulanan grup.

İskemi oluşturmak için Pulsinelli ve Brierly'nin dört damar oklüzyon modeli kullanıldı [10,11]. Anestezi IM olarak 3 mg/kg xylazin (Rompun, Bayer) ve 40 mg/kg ketamin HCl (Ketalar, Eczacıbaşı) ile sağlandı. Hiçbir hayvana hemodinamik ve solunum desteği gerekmedi. Anestezi sonrası her iki common carotid arter ön midline servikal insizyonla explore edildi. Kalın ipek sütür materyali (2/0) karotis akımını kesmeyecek şekilde gevşekçe her bir arter etrafına dönülerek yerleştirildi ve sütürler insizyon hattından dışarı çıkarıldı. Sonra tek bir sütür ile insizyon kapatıldı. İkinci bir insizyon boyun dorseline orta hattına yapıldı ve her iki vertebral arter bipolar elektrokoter ile birinci servikal vertebranın alar forameni boyunca koterize edildi. Daha sonra hayvanların uyanması için bir gün beklenildi. Hayvanlar uyandıktan sonra 30 dk süreyle karotid akım kesilecek şekilde ipekler sıkıştırıldı. Vücut ısısı işlem sırasında ve işlemden sonraki 30 dk süreyle 37 OC de sabit tutuldu. 30 dakika sonra karotis etrafındaki ipekler gevşetildi ve karotis akımının restore olduğu direkt olarak gözlemlendi. Grup 2 ve 3'deki hayvanlarda 20 dk süreyle reperfüzyon uygulandı. İntraperitoneal olarak 0.05 ml/ 100 gr olacak şekilde verilen yüksek doz Nembutal ile sacrifice edildi. Bu işlem sonrası kafatası açılarak tüm beyin ve beyincik dokuları çıkarıldı. Çıkarılan dokular iki eşit parçaya bölünerek yarısı biyokimyasal analiz yarısı histopatolojik inceleme için alındı. Biyokimyasal analiz için dokular serum fizyolojikle yıkayıp aliminyum folyaya sarılarak -80°C derin dondurucuya yerleştirildi.

Biyokimyasal İnceleme:

Beyin dokusu MDA düzeyleri Ohkawa ve ark. [12] nin geliştirdiği yöntemle ölçüldü. Beyin dokusunun 1 gramına 9 ml %1.15 KCl eklendi (1:10) ve teflon uç yardımıyla ultratunnax T25 Homogenizer ile homojenize edildi. Daha sonra 0.2 ml %10 (w/v) doku homojenatı, 0.2 ml %8.1 sodyum dodekilsülfat (SDS) ve 1.5 ml %20 asetik asid solusyonu ilave edilip 1.5 ml %0.8 aköz tiyobarbitürik asit solusyonundan katılarak, son hacim 4 ml olacak şekilde distile su ile tamamlandı. 60 dakika 95°C sıcak kaynar su banyosunda inkubasyondan sonra çesme suyu ile soğutulurak, 1 ml distile su ve 5 ml n-butanol-piridine karışımından (15:1 v/v) eklendi ve santrifüj edilerek üstteki organik tabaka alındı ve 532 nm dalga boyunda absorbans ölçümü yapılarak MDA düzeyleri hesaplandı.

Beyin dokusunda GSH-Px aktivitesi NADPH'in glutatyon reduktaz enzimi ile oksidasyonu esasına dayalı olarak çalışan Paglia ve arkadaşları [13]'nin metoduna göre ölçüldü. Beyin doku örnekleri %0.9 NaCl ile yıkandıktan sonra 0.05 M fosfat tamponu (pH:7) ile 10 kat sulandırılarak teflon uçlu ultra-Tunnax T25 Homogenizer ile 4 dakika aerobik şartlarda homojenize edildi. Daha sonra 15 000 rpm de 10 dakika santrifüj edilerek elde edilen supernatantlarda GSH-Px aktivite tayinleride yapıldı. Doku protein düzeyleri ise Lowry metodu ile ölçüldü [14].

Histolojik inceleme:

Histolojik inceleme için hipokampus ve cerebellumdan alınan

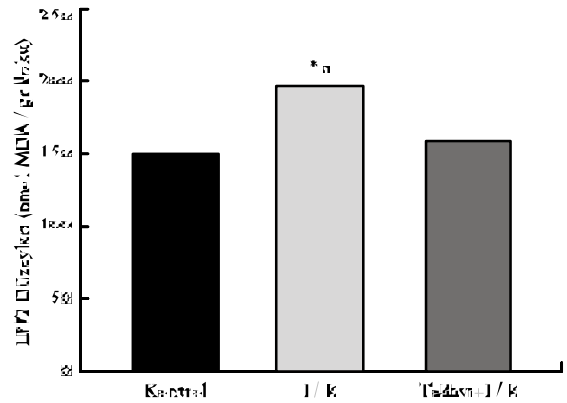
doku örnekleri % 10'luk formolde tespit edilerek rutin takip işleminden sonra parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikrometre kalınlığında elde edilen kesitler hematoksilin eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda (Olympus BX 50, Japan) değerlendirildi. Hipokampus bölgesindeki pramidal hücreler ile cerebellumdaki purkinje hücreleri yapısal yönden değerlendirildi.

İstatistik:

Elde edilen veriler ortalama \pm standart deviasyon olarak alındı. İstatistiksel analiz için grup içi ve gruplar arası varyans analizi için paired t testi (Mann Withney U) uygulandı. P<0.05 anlamlı olarak kabul edildi.

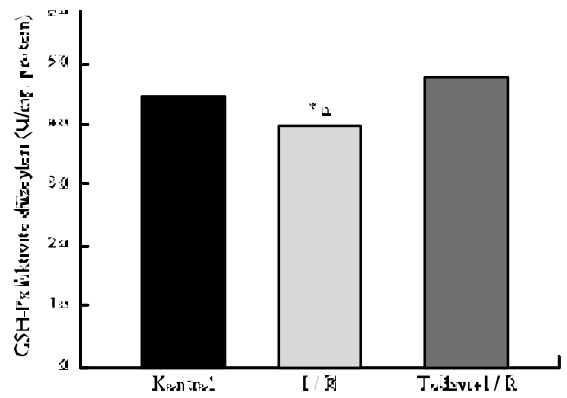
Bulgular

Kontrol grubunda MDA düzeyi 150.61 ± 8.08 nmol/gram doku iken İ / R grubunda reperfüzyon sonrası 197.47 ± 8.49 nmol / gram'a, tedavi grubunda ise 159.01 ± 9.37 nmol / gram'a yükseldi. Tedavi + İ / R grubundaki artış anlamlı bulunmazken (p>0.05), İ / R grubundaki artış hem kontrol hem de tedavi grubu kıyasla istatistiksel olarak anlamlıydı (p< 0.001).



Şekil 1: Grupların reperfüzyon sonrası serebral doku lipid peroksidasyon düzeyleri (LPO: Lipid peroksidasyon, I / R: İskemi - reperfüzyon)

*p<0.001 (Kontrol - I / R grubu), a p<0.001 (I / R grubu - Tedavi + I / R grubu)



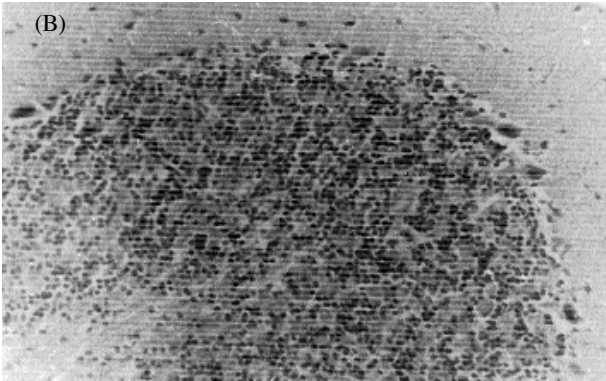
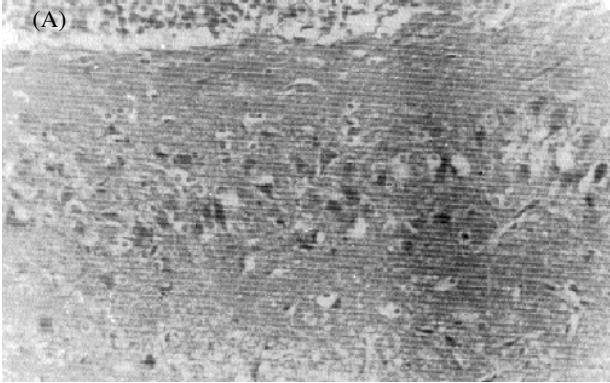
Şekil 2: Grupların reperfüzyon sonrası serebral doku glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri (GSH-Px: Glutatyon peroksidaz aktivite düzeyleri, I / R: İskemi -reperfüzyon)

*p<0.001 (Kontrol - I / R grubu), a p<0.001 (I / R grubu - Tedavi + I / R grubu)

(Şekil 1-2)

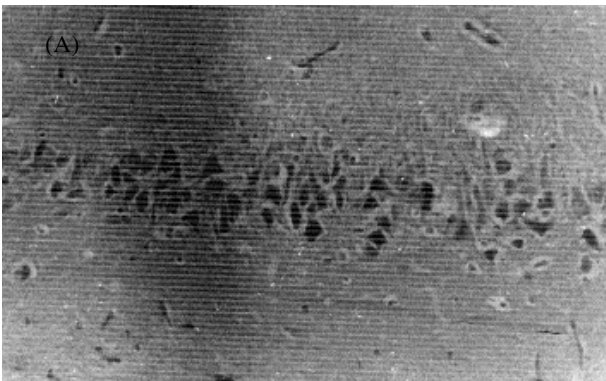
Kontrol grubunda 44.41 ± 2.61 U / mg protein olan GSH - Px aktivite düzeyi, İ / R grubunda 39.72 ± 2.17 U / mg protein, tedavi grubunda ise 47.62 ± 3.75 U / mg protein olarak bulundu. Kontrol grubu ile tedavi + İ / R grubu arasında istatistiki bir fark bulunmazken ($p > 0.05$), İ / R grubu ile hem kontrol hem de tedavi grubu arasında istatistiki anlam vardı ($p < 0.01$).

İ / R grubundaki deneklerden elde edilen kesitlerin histopatolojik olarak incelenmesinde hipokampus bölgesinde piramidal hücrelerinin nekroze olup ortadan kayboldukları, kalan hücrelerde de yoğun dejenerasyon olduğu (Resim 1 A),

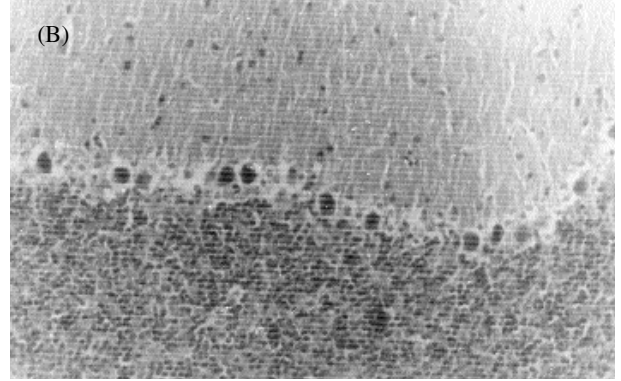


Resim 1: İskemi-reperfüzyon grubunda hücre yapılarında sayıca azalma ve kalan hücrelerde ise yoğun dejenerasyon izlenmektedir: Pramidal hücreler (A), purkinje hücreleri (B).

purkinje hücrelerinin ise sayıca azaldığı gözlemlendi (Resim 1 B). Flavonoid ile tedavi uygulandıktan sonra İ / R uygulanan gruptaki kobayların kesitlerinde ise hem pramidal (resim 2 A) hem de purkinje hücrelerin (resim 2 B) sayı ve yapı olarak



daha iyi durumda oldukları görüldü.



Resim 2: Flavonoid tedavisi sonrası iskemi reperfüzyon uygulanan grupta hücre yapıları iskemi-reperfüzyon grubuna göre sayı ve yapı olarak daha iyi durumda izlenmektedir: Pramidal hücreler (A), purkinje hücreleri (B).

Tartışma

Postiskemik dokularda major serbest oksijen radikalleri (SOR) kaynağı olan xyanin oxydase enzimi, reperfüzyon sonrası moleküler oksijeni kullanarak hypoxanthini xanthine çevirir. Ancak bu işlem sırasında da süperoksit anyonu açığa çıkar. Süperoksit ve hidrojen peroksit zayıf reaktivler olup dokuda direk bir hasar oluşturmazlar. Demir gibi metallerin varlığında daha güçlü reaktivlere çevrilirler ve hücre hasarına katkıda bulunurlar [1].

İskemi ve reperfüzyon süresi çeşitli organlar için değiştiği gibi, beyin için de farklı çalışmalarda farklı süreleri uygulayan modeller mevcuttur. Beyinde 10 dakika gibi kısa bir sürede iskemik hasarın oluştuğunu ve reperfüzyon hasarının oluşması için de 15 dakikalık bir sürenin yeterli olduğunu gösteren yayınlar vardır [15, 16]. Biz de 30 dakikalık iskemiye takiben 20 dakikalık reperfüzyon ile hasar oluştuğunu gözlemledik.

SOR artışı lipid peroksidasyonunu indükleyerek endotelial bütünlüğü bozup endotelial tabakada polimorphonuclear lökosit (PNL)'lerin adhezyon ve akümülyasyonunu artırarak yeni radikal üretimine yol açar [17]. Bu olaylar sırasında araşidonik asit metabolitlerinin açığa çıkışı ve dolayısıyla inflamatuvar cevap da artar. Bradikinin nonspesifik inflamatuvar bir ajan olarak hem mikrovasküler flow hem de makromoleküllerin geçişini artırmak suretiyle ödeme katkıda bulunur [18].

İskemi reperfüzyon sonrası ortaya çıkan değişiklikler inflamatuvar cevap sırasında karşılaşılan mikrosirkulasyon değişiklikleriyle benzerdir. Kemotaktik akümülyasyon, dolaşan lökositlerin aktivasyonu ve adhezyonu bu olaydaki en belirgin özelliklerdir [19, 20]. Adheran lökositler ve aktive olmuş mast hücreleri histamin, bradikinin, 5-OH triptamin gibi kontraktileti artırıcı ve prostoglandin gibi permeabilite artırıcı maddelerin salınımını da artırır. Histamin ve bradikinin, direkt reseptörler yoluyla endotelial hücreleri stimüle eder ve permeabilite artışına yol açar. Lökotrien B4 (LTB4) ise, lökositleri hedef olarak aktivasyonlarını artırır ve bu da SOR üretim artışına yol açar.

Malonyldialdehit (MDA) lipid peroksidasyonunun son ürünüdür ve lipid peroksidasyonunun major göstergesidir. Serbest radikaller oksidatif metabolizma sırasında oluşur ancak genelde iyi kontrol edilir. Bu kontrolde süperoksit dismutaz (SOD) ve Glutatyon peroksidaz (GSH-Px) gibi önemli intraselüler defansive enzimler rol oynar. Santral sinir sistemi serbest radikal hasara daha duyarlıdır ve bu durum relatif

olarak daha az SOD'a sahip olmayla açıklanabilmektedir [3]. Çalışmamızda kullandığımız Daflon adlı ilaç %90 flavone diosmin, %10 flavone hesperidin içerir. Reperfüzyon hasarında etkili olduğu bilinmekle beraber bu etki mekanizması tam olarak ortaya konamamıştır. Bu etkinin lipooxygenase inhibisyonuna [21] ve intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) inhibisyonu yoluyla lökosit tutulumunun azalmasına [22, 23] bağlı olduğu düşünülmektedir. Diosminin lipid peroksidasyonunu inhibe etmede vitamin E kadar etkili olduğu gösterilmiştir [24]. Diosminin araşidonik asidin otoperoksidasyonu ile indüklenen bakır şelasyonuna yol açtığı bilinmektedir [25]. Rat karaciğer çalışmalarında flavonoidlerin hem enzimatik hem de non-enzimatik yolla oluşan süperoksit anionların oluşumunu azalttığı gösterilmiştir [9].

Alloksan adlı ilacın IV infuzyonuyla oluşturulan deneysel hiperglisemi çalışmasında flavonoid verilen deneklerde SOR artışına bağlı gelişen hiperglisemi düzeylerinde kontrol gruba göre belirgin bir azalma görülmüştür [17]. İnsan lokositleri ile yapılan çalışmalarda da oluşan serbest radikaller chemoluminescence (CLL) tekniğiyle ölçülmüş ve flavonoid verilmesiyle SOR oluşumunda azalma olduğu gösterilmiştir [26].

Gerbillerle yapılan serebral iskemi çalışmalarında flavonoidlerin 5 lipooxygenase inhibisyonu ile lökotrien C4 (LT C4) ve lökotrien D4 (LT D4) üretimindeki artışı %80 oranında azalttığı bildirilmiştir [16]. Gerbillerle yapılan bir başka çalışmada ise karotid ligasyon ile geçici iskemiyi takiben oluşan reperfüzyon sırasında hidroksil radikal düzeyleri araştırılmıştır. Kontrol grubunda 7.34 ± 0.88 ng/mg protein olan hidroksil düzeyi 100 mg/kg dozunda daflon verilen deneklerde 0.45 ± 0.09 ng/mg protein olarak bulunmuştur [27]. Çalışmamızda da iskemi-reperfüzyon uygulanan deneklerde GSH-Px aktivitesini aşacak düzeylerde lipid peroksidasyonu olduğu ve bu durumun flavonoidle tedavi edilen grupta daha az olduğu görüldü. Global serebral iskemi-reperfüzyon modellerinde hipokampus bölgesindeki piramidal hücreler iskemiyi en duyarlı hücreler olup, değerlendirmelerde bu hücrelerin kaybı kriter alınmaktadır [11,28]. Bizde çalışmamızda yaptığımız histo-patolojik incelemede flavonoid tedavisi sonrası I / R uygulanan grupta hipokampus bölgesinden ve serebellumdan elde edilen kesitlerde hücre formasyonunun oldukça iyi korunduğu gözledik.

Sonuç olarak; etki mekanizmasından çok, etkinliğini araştırdığımız bu çalışmada elde ettiğimiz bu bulgular, flavonoidlerin iskemi sonrası reperfüzyona bağlı gelişen doku hasarını önlemede oldukça etkili olduğunu düşündürmektedir. Ancak daha farklı çalışmalarla bu tezin desteklenmesi gerektiğini düşünmekteyiz.

Kaynaklar

1. Grace PA: Ischemia-Reperfusion injury. *British Journal of Surgery*. 1994; 81:637-47.
2. Kukreja R, Hess ML: The oxygen free radical system: from equations through membrane-protein interactions to car diovascular injury and protection. *Cardiovasc Res* 1992; 26:641-55.
3. Jianping S: Ischemia, reperfusion and no-reflow phenomenon. Svenson LG, Crawford ES; *Cardiovascular and Vascular Disease of the Aorta*, Philadelphia. WB Saunders Company 1997.
4. Coselli JS, Büket S, Djukanovic B: Aortic Arch Operation: Current Treatment and Results. *Ann Thorac Surg* 1995; 59:19-27.
5. Pagano D, Carey JA, Patel RL, Allen SM, et al: Retrograde

- cerebral perfusion: clinical experience in emergency and elective aortic operations. *Ann Thorac Surg* 1995;59:393-7.
6. Tabashi KT, Ohmi M, Togo T, et al: Aortic arch aneurysm repair using selective cerebral perfusion. *Ann Thorac surg* 1994;57:1305-10.
7. Braughler JM, Hall ED: Central nervous system trauma and stroke. Biochemical considerations for oxygen radical formation and lipid peroxidation. *Free Radic Biol Med*. 1989;6:289-301.
8. Griep RB, Ergin MA: Aneurysms of aortic arch. Edmonds LH; *Cardiac Surgery in the Adult*, New York, McGraw-Hill 1997.
9. Robak J, Gryglewski RJ: Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 1988;37:837-41.
10. Choi SR, Saji H, Iida Y, Magata Y, et al: Ginseng pretreatment protects against transient global cerebral ischemia in the rat: measurement of local cerebral glucose utilization by [¹⁴C] deoxyglucose autoradiography. *Biol Pharm Bull* 1996;19: 644-6
11. Clemens JA, Stephenson DT, Smalstig EB, et al: Reactive glia express cytosolic phospholipase A2 after transient global forebrain ischemia in the rat. *Stroke* 1996;27:527-35
12. Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K: Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acidre action. *Analytical Biochemistry* 1979;95:351-58.
13. Paglia DE, Valentine WN: Studies on quantitative and qualitative characterization of erythrocyte glutathione peroxidase. *J Lab Clin Med* 1967;70:158-69.
14. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, et al: Protein measurment with the folin phenol reagent. *J. Biol Chem* 1951;193:262-75.
15. Islekel S, Islekel H, Guner G, et al: Alterations in superoxide dismutase, glutathione peroxidase and catalase activities in experimental cerebral ischemia-reperfusion. *Res Exp Med* 1999;199: 167-76
16. Ban M, Tonai T, Kohno T, et al: A flavonoid inhibitor of 5-lipoxygenase inhibits leukotriene production following ischemia in gerbil brain. *Stroke* 1989;20:248-52
17. Lonchamp M, Guardiola B, Sicot N, et al: Protective effect of a purified flavonoid fraction against reactive oxygen radicals. *Arzneim-Forsch /Drug Res*. 39;8:882-85.
18. Stucker O, Bonhomme E, Lenaers A, et al: Daflon 500 mg depresses bradykinin-ischemia-induced microvascular leakage of FITC Dextran in rat cremaster muscle. *Inter Angiol* 1989;8:39-43.
19. Granger DN, Benoit JN, Suzuki M, et al: Leukocyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1989;257:G683-8.
20. Hernandez LA, Grisham MB, Twohig B, et al : Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 1987;253:699-703.
21. Labrid CL, Perdrix L: Mechanisms of oedema: activity of daflon 500 mg. *Phelobology suppl*. 2(1992) 30-6
22. Pickelman S, Nolte D, Leiderer R, et al: Effects of phlebotropic drug Daflon 500 mg on postischemic reperfusion injury in striated skin muscle: a histomorphologic studyin the hamster. *J Lab Clin Med* 1999;134:536-45
23. Korthuis RJ, Gute DC: Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction. *J Vasc Res* 1999;36:15-23
24. Santus R, Perdrix L, Haigle J, et al: In vitro studies on a

- flavonoid fraction-induced inhibition of lipid peroxidation. Eur J Pharmacol 1990;183:692-3.
25. Santus R, Perdrix L, Haigle J, et al: Daflon as a cellular antioxidant and a membrane-stabilizing agent in human fibroblasts irradiated by ultraviolet a radiation. Photodermatol Photoimmunol Photomed 1991;8:200-5.
 26. Poivetin B: Inhibitor effect of daflon upon the production of free oxygenated radicals by human neutrophil granulocytes. Angiology 1985;37:20-4.
 27. Delbarre B, Delbarre G, Calinon F: Effect of Daflon 500 mg, a flavonoid drug, on neurological signs, levels of free radicals and electroretinogram in the gerbil after ischemia-reperfusion injury. Int J Microcirc 1995;15:27-33.
 28. Herguido MJ, Carceller F, Roda JM, et al: Hippocampal cell loss in transient global cerebral ischemia in rats: a critical assesment. Neuroscience 1999;93: 71-80.