

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SEVOFLURAN ANESTEZİSİ ALTINDA TURNİKE UYGULANAN
CERRAHİ ARTROSKOPİ OLGULARINDA
E VİTAMİNİNİN NÖTROPİLLERDE KALSİYUM SİNYALİ VE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Hacı Ömer OSMANLIOĞLU

**ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI
UZMANLIK TEZİ**

1. Tez Danışmanı

Doç. Dr. Lütfi YAVUZ

2. Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa NAZİROĞLU

ISPARTA - 2011

T.C.
SÜLEYMAN DEMİREL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

**SEVOFLURAN ANESTEZİSİ ALTINDA TURNİKE UYGULANAN
CERRAHİ ARTROSKOPİ OLGULARINDA
E VİTAMİNİNİN NÖTROFİLLERDE KALSİYUM SİNYALİ VE
OKSİDATİF STRES ÜZERİNE ETKİLERİ**

Dr. Hacı Ömer OSMANLIOĞLU

ANESTEZİYOLOJİ VE REANİMASYON ANABİLİM DALI

UZMANLIK TEZİ

1. Tez Danışmanı

Doç. Dr. Lütfi YAVUZ

2. Tez Danışmanı

Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU

Bu tez Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Koordinasyon Birimi tarafından 2381-TU-10 proje numarası ile desteklenmiştir.

ISPARTA - 2011

TEŞEKKÜR

Tez çalışmamın oluşturulmasında ve yürütülmesinde her türlü desteği gösteren ve deneyimlerini esirgemeyen, eğitimime büyük katkıda bulunan 1. danışman hocam Doç. Lütfi YAVUZ ve 2. Danışman hocam Prof. Dr. Mustafa NAZIROĞLU'na;

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerini bizlerle paylaşan, değerli hocalarım Prof. Dr. Füsun EROĞLU, Prof. Dr. Sadık ÖZMEN, Doç. Dr. Pakize KIRDEMİR, Doç. Dr. Dilek KARAASLAN, Yrd. Doç. Dr. Tülay TUNÇER PEKER, Yrd. Doç. Dr. Berit GÖKÇE CEYLAN, Yrd. Doç. Dr. Filiz ALKAYA'ya;

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma, tüm yoğun bakım, ameliyathane çalışanlarıma;

Tez çalışmama olgu sağlama konusundaki desteklerinden dolayı Ortopedi ve Travmatoloji AD'ndaki tüm hocalarıma ve asistan arkadaşlarıma;

Kan örneklerini büyük bir titizlik ve fedakarlıkla çalışan Yrd. Doç. Dr. Cihangir Uğuz ve Bilal Çiğ olmak üzere tüm Biyofizik A.D. çalışanlarıma;

Çalışma süresince verdikleri destekten dolayı Süleyman Demirel Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Koordinasyon Birimine ve çalışanlarına;

Beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan, her konuda destek olan sevgili eşim Esmahanıma, kızım Saadet Vera ve oğlum Muhammed Bera'ya

Sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. H. Ömer OSMANLIOĞLU

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR	ii
İÇİNDEKİLER	iii
KISALTMALAR	v
TABLolar DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Temel Mekanizmaları	4
2.1.1.İskemi-Reperfüzyon Hasarına Anestezi Dışı Yaklaşım	6
2.1.2.İskemi Reperfüzyon Hasarına Anestezik Yaklaşım	8
2.2.Oksidatif Stres.	10
2.2.1.Serbest Radikaller.....	10
2.2.1.1.Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri.....	12
2.2.2.Antioksidanlar	13
2.2.2.1.Enzimatik Antioksidanlar.....	14
2.2.2.2.Enzimatik Olmayan Antioksidanlar	14
2.2.2.2.1.E Vitamini.	15
2.3.Hücre İçi Kalsiyum Sinyali.....	15
2.3.1.Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi.....	15
2.3.2.Hücre İçi Kalsiyum Sinyalinin Oluşumu	15
2.4.Anestezi Türünün ve Anestezik Ajanın Seçimi	17
2.4.1.Genel Anestezi	18
2.4.1.1.İnhalasyon Anestezikleri.....	18
2.4.1.2.Nonopioid İntravenöz Anestezikler	19
2.4.1.2.1.Diisopropilfenol - disoprofol (propofol)	19
3. MATERYAL-METOD	21
3.1.Hasta-Kontrol Populasyonun Seçimi.....	21
3.2.Kullanılan Malzemeler ve Aletler	22
3.3.Kullanılan Kimyasal Maddeler	23
3.4.Nötrofil İzolasyonu.....	23

3.5.Antioksidan Enzim Aktivitesi Ölçümü.....	24
3.5.1.GSH ve GSH-P _x Analizleri	24
3.5.2.Lipit peroksidasyonu (MDA) Analizi.....	26
3.6.İntrasellüler Kalsiyum Ölçülmesi.....	26
3.7.İstatiksel Analiz.....	27
4. BULGULAR.....	28
5.TARTIŞMA ve SONUÇ	35
ÖZET.	39
ABSTRACT.	40
KAYNAKLAR.....	41

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	Adenozin trifosfat
C3a	Kompleman 3a
C5a	Kompleman 5a
Ca ⁺²	Kalsiyum iyonu
[Ca ⁺²] _i	Hücre içi kalsiyum konsantrasyonu
c-AMP	Siklik Adenomonofosfat
CCl ₃ ·	Triklormetil
CCl ₄	Karbon tetraklorür
c-GMP	Siklik guanozinmonofosfat
CRP	C- Reaktif Protein
Cu ⁺²	Bakır iyonu
DAG	Diaçilgliserol
DHLA	Dihidrolipoik asit
DM	Diabetes Mellitus
DNA	Deoksiribonükleik asit
ER	Endoplazmik Retikulum
ESH	Eritrosit Sedimentasyon Hızı
GPKR	G Proteini Kenetli Reseptör
GSH	Glutasyon (İndirgenmiş Glutasyon)
GSH-Px	Glutasyon peroksidaz
GSSG	Okside (Yükseltgenmiş) glutasyon
HES	Hidroksietil Nişasta
H ₂ O ₂	Hidrojen peroksit
IL	İnterleukin

KAT	Katalaz
LA	α -Lipoik Asit
LDL	Düşük dansiteli lipoprotein
LPO	Lipit Peroksidasyonu
LPS	Lipopolisakkarit
LS	L-selektin
LTB 4	Lökotrien B 4
MDA	Malondialdehit
NAD(P)H	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat
NF- κ B	Nükleer faktör kappa-B
NO	Nitrik oksit
NOS	Nitrik oksit sentaz
NSAİİ	Non Steroid Anti İnflamatuar İlaç
O ₂	Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
¹ O ₂	Singlet oksijen
·OH	Hidroksil radikali
ONOO	Peroksinitrit
PBS	Phosphate buffer saline
PKC	Protein kinaz C
PLC	Fosfolipaz C
PMNL	Polimorfonükleer lökosit
PUFA	Çoklu doymamış yağ asidi
ROO·	Peroksil
ROT	Reaktif oksijen türleri
sGC	Solubl guanilat siklaz

s-ICAM-1	Soluble intercelluler adhesion molecule-1
SLE	Sistemik Lupus Eritematozus
SOD	Süperoksit dismutaz
SSRİ	Selektif Serotonin Reuptake İnhibitörleri
TBA	Tiyobarbitürik asit
TBARS	Tiyobarbitürik asit reaktif türleri
TIVA	Total İntravenöz Anestezi
TNF- α	Tümör nekroz faktör- α
TRX	Tiyoredoksin
TSH	Tiroid Stimulan Hormon
VCAM-1	Vasküler celluler adhezyon molecule-1
Zn	Çinko

TABLULAR DİZİNİ

Tablo 1. Bazı dokular için kritik iskemi süreleri	3
Tablo 2. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar	26
Tablo 3. Grupların demografik özellikleri.....	28
Tablo 4. Grupların ortalama hemodinamik değerleri.....	28
Tablo 5. Olgularda nötrofil lipit peroksidasyon , glutasyon ve glutasyon peroksidaz değerleri üzerinde E vitamini' nin etkileri.	32

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1. İskemi ve reperfüzyon sırasında meydana gelen fizyolojik olaylar	5
Şekil 2. E vitamininin antioksidan özelliği.....	8
Şekil 3. GPKR (G Proteini Kenetli Reseptör) aracılı Ca^{+2} sinyali	17
Şekil 4. Grupların preoperatif ve postoperatif periyottaki Ca^{+2} sinyali analiz sonucu...29	
Şekil 5. Grup N preoperatif-N1 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu	29
Şekil 6. Grup N postoperatif-N2 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu.....	30
Şekil 7. Grup E preoperatif-E1 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu	30
Şekil 8. Grup E postoperatif-E2 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu.....	31
Şekil 9. Preoperatif ve Postoperatif Ca^{+2} Salınımı.....	31
Şekil 10. Olgularda nötrofil lipit peroksidasyon (LP) düzeyi üzerinde E vitamininin etkileri.	32
Şekil 11. Olgularda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerinde E vitamininin etkileri.	33
Şekil 12. Olgularda glutatyon (GSH) düzeyleri üzerinde E vitamininin etkileri.....	33

1. GİRİŞ

İskelet kasında turnike uygulamasına bağlı oluşan iskemi-reperfüzyon hasarı, temel mekanizması nötrofil aktivasyonu olan bir çeşit enflamasyondur. İskemik hasardan korunmak için kan akımının yeniden sağlanması çok önemli olmasına rağmen, reperfüzyonun sağlanmasıyla birlikte nötrofil birikmesi, mikrovasküler bariyerde bozulma ve ödem oluşmasıyla giden kompleks bir dizi reaksiyon başlar. Lökositlerin endotele yapışarak postkapiller venüllerden geçişinin başlaması, reperfüzyon hasarının temelinde yatan önemli bir olaydır. Lökositlerin dokularda birikmesi, çeşitli oksidanların, enzimlerin ve sitokinlerin açığa çıkmasını sağlayarak, parenkimal hücrelerde hasara neden olur. Bugüne kadar kasta turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını azaltmak için bir dizi kimyasallar, ilaçlar ve fiziksel yöntemler denenmiştir. Bununla birlikte, E vitamini'nin bu hasarda koruyucu etkilerinin gösterilmesi de oldukça önem taşımaktadır.

Artroskopik diz cerrahisinde; kansız bir cerrahi saha sağlamak için uygulanan turnike, kan akımının oklüzyonu sonucunda iskemiye neden olmaktadır. Turnikenin açılmasını takiben de iskemi-reperfüzyon hasarı (reperfüzyon sendromu) oluşmaktadır. İskemi sonrası tekrar kan akımının ve dolayısıyla oksijenin dokuya sunumu, serbest radikallerin meydana gelmesine neden olur. Oluşan serbest radikaller, hücre zarındaki makromolekülleri perokside ederek doku hasarına yol açar. Makromoleküllerden en önemlisi lipitlerdir. Lipit peroksidasyona, poliansatüre yağ asitlerinin oksidasyonuna, hücre zarının yapısının bozulmasına ve malondialdehit gibi toksik metabolitlerin oluşmasına neden olan reaksiyonlar zinciridir.

Ekstremitte iskemisi sonrası reperfüzyon sendromunun iki komponenti vardır:

1. Reperfüzyonu takiben ortaya çıkan lokal cevap; doku hasarını artırıcı potansiyeli olan ekstremitte şişliğinden ibarettir.
2. Multipl organ yetersizliğine ve ölüme yol açan sistemik cevap.

Artroskopik diz cerrahisinde uygulanan turnikenin yol açtığı iskemi-reperfüzyon hasarını hafifletmek için "iskemiye şartlandırma" gibi birçok yöntemin kullanıldığı, peroksidasyonun önlemesi için "n-asetil sistein, adenosin, propofol, halotan" gibi ajanların kullanıldığı klinik çalışmalar vardır. Bu çalışmaların çoğunda kullanılan

yöntemlerin ve ajanların reperfüzyon hasarına olumlu etkilerinin olduğu gösterilmiştir. Fakat koruyucu rollerinin nasıl gerçekleştiği konusunda yeterince bilgi yoktur. Sitozole Ca^{+2} akışı, mitokondride depolarizasyon ve birçok moleküler aktivasyon mekanizması ile serbest radikallerin oluşumunu artırmaktadır. Artan serbest radikaller, bir kısım katyon kanallarına zarar vererek sitozole Ca^{+2} akışını daha artırmakta ve serbest oksijen radikallerinin oluşumu daha da artmaktadır. Sitozolda artan serbest radikaller ve Ca^{+2} nötrofilleri tetiklemekte ve fagositik aktiviteyi uyarmaktadır. E vitamini yağda eriyen kuvvetli bir antioksidandır.

Bu çalışmada:

1. Artroskopik cerrahide kullanılan turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını önlemede, E vitamini'nin etkilerinin karşılaştırılması amaçlandı.
2. Sevefloranın serbest oksijen radikallerin oluşumunu artırdığı alyuvarlar ve plazmada iyi bilinmesine rağmen nötrofillerdeki etkisi konusunda yeterince bilgi yoktur. Bu tez çalışmasında sevefloranın neden olduğu oksidatif stres artroskopik hastaların nötrofillerinde araştırıldı.
3. İskemi/reperfüzyon olaylarının serbest oksijen radikallerinin oluşumunu artırdığı ve sitozelde Ca^{+2} artışı nötrofillerin fagositik aktivitesini artırdığı ve dolayısıyla her iki olayın doku zedelenmesine neden olduğu çok iyi bilinmesine rağmen moleküler mekanizmaları bilinmemektedir. Çalışmamızda sitozolde Ca^{+2} artışı ve nötrofillerdeki serbest oksijen radikallerinin oluşumunun artışı E vitamini önleyebilir mi sorusunun cevabı arandı.

2. GENEL BİLGİLER

Pnömotik turnike ilk defa 1904 yılında Harvey Cushing tarafından tanımlanmış olup, günümüz ekstremite cerrahisinde yaygın olarak kullanılmaktadır (1). Kansız ortam sağlayarak girişimi kolaylaştırması, kan kaybını azaltarak transfüzyon ihtiyacını sınırlaması ve ameliyat süresini kısaltması gibi avantajları vardır (2). Turnikenin uzun süreli kullanımı konusunda 2 saatlik süre genellikle güvenli olarak kabul edilmekle birlikte, sınırları 1-3 saat arasında değişebilmektedir (3). Turnike basıncının ise hastanın yaşı, kan basıncı ve ekstremitenin boyutuna göre ayarlanması gerekliliğine rağmen, bu konuda genel kabul edilen görüş; turnikenin sistolik kan basıncından üst ekstremitte için 50-75 mmHg, alt ekstremitte için ise 100-150 mmHg fazlasına kadar şişirilebileceğidir (2). Ancak turnike kullanımına bağlı olarak ortaya çıkan nöromusküler, hemodinamik ve metabolik değişiklikler göz önüne alındığında, bu sürenin ve basıncın en aza indirilmesinin ve olası hasarı azaltacak anestezik yaklaşımın önemi ortaya çıkmaktadır (4).

Reperfüzyon sonucu meydana gelebilecek sonuçları öngörebilmek için iskemik dokuda hücre ölümüne kadar gidebilecek değişiklikleri iyi anlamak gereklidir. Dokuların iskemiye olan dayanıklılığı farklıdır ve tolerabiliteleri kollateral dolaşımın olup olmaması ile doğrudan ilişkilidir. Dokuların iskemiye tolerans sürelerinin en doğru değerlendirmesi, ekstremitte replantasyonu ile indüklenen mutlak iskemiye bağlıdır. Genellikle normotermik bir ortamda iskemiye dayanma süresi maksimum, kaslar için 4 saat, nöronlar için 8 saat (reversibl), yağ dokusu için 13 saat, deri için 24 saat ve kemik dokusu için 4 gündür (5) (Tablo 1).

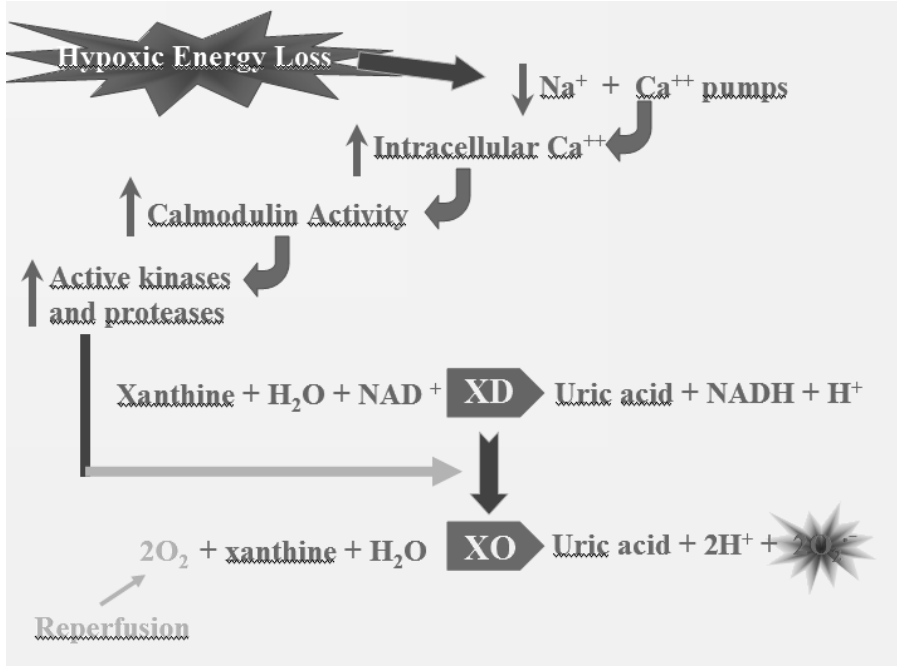
Tablo 1. Bazı dokular için kritik iskemi süreleri

<i>Doku</i>	<i>Kritik İskemi Süresi</i>
Kas	4 Saat
Nöron	8 Saat
Yağ	13 Saat
Deri	24 Saat
Kemik	4 Gün

2.1 İskemi-Reperfüzyon Hasarının Temel Mekanizmaları

Turnike uygulamasına bağlı nöromüsküler hasar doğrudan basınç ve doku deformasyonu ile ilişkili olduğu kadar, iskemi ve iskemi sonrası reperfüzyon hasarıyla da yakından ilişkilidir (6). Turnike, manşonun altındaki ve distalindeki dokuların kan akımını engeller. Az miktarda bir kan akımı intramedüller yolla oluşturulsa da, bu akım kaslardaki aerobik metabolizmanın devamını sağlayamaz. Kısa süreli iskemi reaktif hiperemi ve arteriyel vazodilatasyona neden olurken, 30 dk'dan 4 saate kadar uzayan iskelet kas iskemisini takiben, reperfüzyonla mikrosirkülatuar düzeyde bozukluklar ve yaygın doku ödemi gelişir (6). Oluşan bu ödem reperfüzyon geri sağlansa dahi hücre beslenmesini daha da bozar (7). İskelet kasında meydana gelen iskemi-reperfüzyon hasarında esas olarak, ksantin oksidaz ve nötrofilik nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz enzimlerinin etkileri sonucu açığa çıkan, sitotoksik potansiyele sahip serbest oksijen radikalleri sorumlu tutulmaktadır (8). Mitokondriyal oksijen düzeylerinin iskemiyle azalmasıyla birlikte, kas hücrelerinde aerobik metabolizma azalır. Hücrenin enerji depoları homeostatik fonksiyonları devam ettirebilmek amacıyla tüketilir. Adenozin trifosfat (ATP) gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı hipoksantin birikmesine neden olur. Reperfüzyon olmadığı sürece biriken hipoksantin ksantine dönüştürülemez. Kas hücreleri enerji üretimi için oksidatif fosforilasyondan anaerobik glikolize geçer. Bunun sonucunda glükoz ve pirüvat azalırken, hücre içi laktik asit üretimi artar. Aynı zamanda, iskemi sürecinde mikrovasküler endoteliumda bulunan ksantin dehidrogenaz enzimi ksantin oksidaz enzimine dönüştürülür (9). Reperfüzyonda reoksijenizasyonun sağlanmasıyla, iskemi sırasında oluşan ksantin oksidaz enzimi, biriken hipoksantini ksantine dönüştürürken çok sayıda serbest oksijen radikalinin de ortama çıkmasına neden olur (10) (Şekil 1).

DNA ve protein artık ürünlerinden hücrelerde ksantin değerlendirilmesi sırasında ksantin dehidrogenaz enzimi kullanılmakta ve ortaya serbest radikaller çıkmamaktadır. Fakat iskemik olaylarda sitozole kalsiyum iyon akışı kinaz ve proteazları aktive etmekte ve ksantin dehidrogenaz yerine ksantin oksidaz enzimi devreye girmektedir. Bu ise ksantinden superoksit ve diğer serbest radikallerin oluşumuna neden olmaktadır (11) (Şekil 1).



Şekil 1. İskemi ve reperfüzyon sırasında meydana gelen fizyolojik olaylar

Oksijen öncelikle süperoksite (O_2^-), ardından da hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikaline ($HO\cdot$) dönüşür. Nötrofillerde bulunan membran bağımlı NADPH oksidaz enzimi ise, iskemi sırasında hücre içerisine kalsiyum akışıyla birlikte aktive olur. Aktive olan enzim NADPH'yi $NADP^{+}$ 'ye çevirirken reperfüzyonda sağlanan moleküler oksijeni de süperokside (O_2^-) indirger (12). Oksijen serbest radikallerinin reperfüzyonda ani ve çok sayıda açığa çıkması direkt endotelial hasara neden olduğu gibi post iskemik dokulara nötrofil infiltrasyonuna neden olarak, oksidatif hasarı daha da artırır (13). Nötrofillerin post iskemik dokulara toplanmasıyla birlikte yüzeylerindeki adezyon molekülleri de aktive olarak (CD_{11}/CD_{18}) vasküler endotel hücrelerinin yüzeyinde bulunan karşı reseptörlerle (ICAM-I) reaksiyona girerler. Oluşan bu $CD_{18}/ICAM-I$ kompleksi nötrofillerdeki oksidanların kas hücrelerine geçişini sağlarken, endotel hasarıyla mikrovasküler bariyeri de bozarak iskemi sonrasında kaslarda kapiller düzeyde akımın olmamasına (noreflow fenomeni) neden olur (8). Dolayısıyla turnike açılıp akım tekrar sağlansa bile hücre düzeyinde beslenme bozulur. Normal şartlarda vücudun antioksidan defans sisteminde yer alan süperoksit dismutaz (SOD), katalaz ve glutasyon peroksidaz gibi endojen enzimler serbest oksijen radikallerini etkin bir şekilde detoksifiye ederken, iskemi ve onu takiben reperfüzyonla çok sayıda serbest radikalin aniden ortaya çıktığı durumlarda yetersiz kalmaktadırlar (14). Oluşan bu serbest

radikaller yapılarındaki "eşlenmemiş elektron" nedeniyle oldukça reaktiftirler ve hücrenin DNA, protein ve lipid yapılarında hasara yol açarak hücre fonksiyonlarını bozarlar (15). Hücredeki tüm biyomoleküller içerisinde oksidatif hasara en hassas olan membran yapısındaki çoklu doymamış yağ asitleridir. Reperfüzyonla açığa çıkan süperoksit radikali ($O_2\cdot^-$) hidroksil radikaline ($HO\cdot$) dönüşerek hücre membranında lipid peroksidasyonunu başlatabileceği gibi, endotel kaynaklı nitrik oksitle (NO) reaksiyona girip "peroksinitrit" oluşumuna neden olarak da lipid peroksidasyonunu başlatabilir (16). Lipid peroksidasyonu bir kez başladıktan sonra kendi kendini devam ettiren zincirleme bir dizi reaksiyon şeklinde ilerler. Bu reaksiyonun sonucunda malondialdehit (MDA) gibi biyolojik olarak aktif ve hücre membranında parçalanmaya neden olan aldehytler açığa çıkar (17). Kısa süreli turnike uygulamalarında dahi, reperfüzyonla birlikte transendotelial migrasyonla ekstrasvasküler dokulara nötrofillerin geçtiği klinik çalışmalarla gösterilmiştir (18,19). Dokuya infiltre olan aktive nötrofiller, serbest radikallerle olan mekanizma dışında, direkt olarak proinflamatuvar sitokinlerin açığa çıkmasını kolaylaştırarak doku hasarını artırabilirler.

Yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda, proinflamatuvar sitokinlerden özellikle tümör nekroz faktör-alfa (TNF- α), interlökin-1 beta (IL-1 β) ve IL-6'nın, iskelet kası iskemisi reperfüzyonunda plazmadaki düzeylerinin belirgin olarak arttığı ve bu sitokinlerin aracılığıyla hem lokal hasarın daha da artırıldığı, hem de uzak organ hasarının tetiklendiği gösterilmiştir. Organlarda nötrofil-endotel reaksiyonuna veya apoptozise neden olarak hasarı başlatmaktadır (20-22).

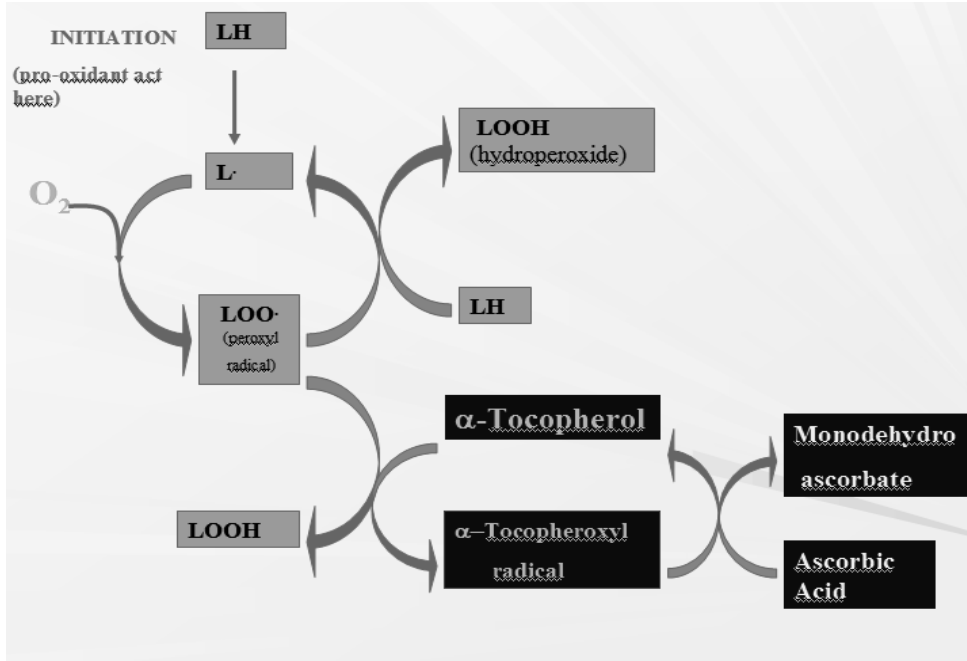
2.1.1 İskemi-Reperfüzyon Hasarına Anestezi Dışı Yaklaşım

İskelet kasında turnikeye bağlı iskemisi-reperfüzyon hasarını azaltmak için, turnikenin kullanım şekliyle ilgili yöntemler denenmiştir. Whetzel ve ark. turnikenin kısa sürelerle gevşetilip reperfüzyonun sağlanarak ardından tekrar turnike uygulama yönteminin (iskemik ön-şartlama) etkin olacağını öne sürmüşlerdir (23). İskemik ön-şartlamanın hasara karşı koruma mekanizması tam olarak açıklanamamakla birlikte, kapiller düzeyde akım durması (no-reflow fenomeni) gelişimini ve lökositlerde infiltrasyonunu azalttığı bildirilmiştir (24,25). Ancak, daha sonra yapılan çalışmalarda, iskemik ön-şartlama ile iskemisi-reperfüzyon hasarının azaltılmasından çok, kasın iskemisi

süresine olan toleransının artırılarak daha uzun süreli turnike kullanımına olanak sağlayacağı yönünde görüşler bildirilmiştir (26,27).

Literatürde turnikenin neden olduğu mikrovasküler hasarı azaltmak için immünosupresifler, kortikosteroidler ve çeşitli antioksidanlar, hem klinik hem de deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Nötrofillerin bu hasarda, mekanizmadaki temel hücre olmasından dolayı, nötrofil aktivasyonu ve sekestrasyonunu önlemeye yönelik kullanılan immünosupresif ajanlar (FK 506 / Takrolimus) ve uzun etkili steroidlerle, kas hasarının azaltılabileceği ileri sürülmüştür (22,28). Enzim olmayan antioksidanlardan ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol, vitamin E (α - tokoferol), vitamin C, 21-aminosteroid, N asetil sistein, glutamin, karvedilol ve mannitol turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarında kullanılmış, serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırarak sitoprotektif ve mikrosirkülasyonu düzenleyici özellikleri olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (29-33). Enzim yapısındaki endojen antioksidanlardan SOD, katalaz ve glutatyon peroksidazın dışardan uygulanmasıyla da hasarın azaltılabileceği önerilse de bu uygulamaların hiçbirisi rutin kullanıma girmeyip deneysel ve klinik araştırmalara konu olarak kalmıştır (34-36).

E vitamini'nin dördü sentetik, dördü de organik olmak üzere 8 alt tipi vardır. Bu alt tipler içerisinde antioksidan özelliğe sahip olan alfa tokoferol alt tipidir (37). E vitamini yapısında bulundurduğu hidrojen iyonlarını hidroksil radikallerine vererek onları inhibe etmektedir (Şekil 2) (38). Süperoksit radikali süperoksit dismutaz enzimi ile hidrojen perokside dönüştürülmektedir. Yapısında selenyumu kofaktör olarak bulunduran GSH-Px enzimi hidrojen peroksiti suya kadar parçalamaktadır. GSH'de serbest oksijen radikallerini ortamdaki uzaklaştırmaktadır.



Şekil 2. E vitamininin antioksidan özelliği.

2.1.2 İskemi-Reperfüzyon Hasarına Anestezik Yaklaşım

Turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarının operasyon sırasında kullanılan anestezik ajanlarla azaltılıp azaltılamayacağı konusu, ilk olarak 1997 yılında Kahraman ve ark. tarafından yapılan bir çalışmayla araştırılmıştır (39). Bu çalışmada turnikeyle ekstremite cerrahisi geçirecek hastalarda bir gruba propofol ile total intravenöz anestezi (TIVA) uygulanırken diğer gruba izofloran ile genel anestezi verilmiştir. Hastaların kas dokusu ve kan örnekleri alınarak lipit peroksidasyonunun son ürünü olan MDA araştırıldığında, TIVA yapılan grupta lipit peroksidasyonunun belirgin olarak azaldığı gösterilmiştir. Daha sonra yapılan benzer bir çalışmada ise propofol halotan ile karşılaştırılmış, halotanlı grupta MDA düzeylerinin artmamasına rağmen, propofolle belirgin olarak baskılandığı gözlemlenmiştir (40). Bu çalışmada halotan kullanılan grupta artış olmaması, izofloran dışındaki tüm inhalasyon anesteziklerinin hücresel düzeyde reperfüzyon hasarına karşı koruyucu özelliği olduğuna bağlanmıştır (39,41). İnhalasyon anestetiklerinden, halotan ve izofloran dışında, turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarında Sevofluran ile çalışma yapılmış, Lucchinetti ve ark. sağlıklı gönüllülerde sedatif konsantrasyondaki Sevofluran (% 0.5-1 End-Tidal) inhalasyonu ile

lökosit aktivasyonu ve adezyonunun önlenerek endotel hasarından korunulabileceğini ileri sürmüşlerdir (42).

Propofol (2,6-diizopropilfenol) yapısı itibariyle bütillenmiş hidrokstitoluen ve endojen antioksidan α -tokoferol (E vitamini) gibi fenol bazlı serbest radikalleri ortamdaki uzaklaştırıcı kimyasallara benzemektedir (43). Propofolün her bir molekülü, iki reaktif oksijen radikalini daha az reaktif fenoksil radikaline dönüştürerek ortamdaki uzaklaştırabilmektedir. Propofolün reperfüzyonla açığa çıkan süperoksit radikalini ($O_2\cdot^-$) endotel kaynaklı NO ile reaksiyona girmesiyle oluşan ve lipid peroksidasyonunu başlatan peroksinitrit oluşumunu da önlediği gösterilmiştir (44,45). Dolayısıyla propofolün kasta turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını önleme mekanizmalarının lipid-peroksil radikalleriyle reaksiyona girip daha stabil propofol-fenoksil radikali oluşturması ve/veya peroksinitriti ortamdaki uzaklaştırması olduğu düşünülmektedir. Propofol yüksek lipid çözünürlüğüne sahip bir anestezi ajan olduğundan, özellikle oksidatif hasara en duyarlı olan lipofilik membranlarda birikerek dokuların antioksidan kapasitesini artırabilmektedir (40,46). Propofolün sadece indüksiyon dozunda veya rejyonel anestezide ilaveten sedasyon amacıyla kullanıldığında hasarı azaltacak yönde olumlu etkilerinin olup olmadığı konusu da araştırılmıştır. Bu amaçla Cheng ve ark. spinal anestezide turnike kullanılarak total diz protezi ameliyatı yapılacak olan hastalarda midazolamla kıyasla propofolü 0.2 mg.kg^{-1} dozda bolus yaptıktan sonra $2 \text{ mg.kg}^{-1}\text{st}^{-1}$ 'den düşük dozu sedasyon amacıyla uygulamışlar ve hasarı anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir (47). Propofolün membranlarda birikici etkisi olmasına rağmen, sadece indüksiyonda kullanılması infüzyon şeklinde devamlı kullanıma göre hasarı azaltmada etkin bulunmamış, operasyon boyunca devamlı infüzyonun önemi vurgulanmıştır (48).

İntravenöz anesteziklerden ketaminin de artroskopik diz cerrahisi geçirecek hastalarda turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını azaltabileceği bildirilmiştir (49). Bu çalışmada, spinal anestezide turnike kullanılarak diz cerrahisi geçirecek hastalara sedasyon amacıyla $0.5 \text{ mg.kg}^{-1}\text{st}^{-1}$ dozunda devamlı ketamin infüzyonu yapılmış, kan ve sinoviyal doku örnekleri alınarak MDA ve hipoksantin düzeyleri araştırılmıştır. Ketamin ile sedasyon yapılan grupta plasebo ile karşılaştırıldığında hem kanda hem de dokuda hasarın belirgin olarak azaldığı, bunun da ketaminin N-metil-D-aspartat reseptörlerini

antagonize ederek kalsiyum girişini önlemesinden ve hedef organa kan akımını artırmasından kaynaklanabileceği açıklanmıştır (49).

Lokal anestetiklerin antioksidan potansiyelleri in vitro sistemlerde ayrıntılı olarak incelenmiş olup, lidokain dışında ropivakain, bupivakain ve mepivakainin insan nötrofillerinde oksidatif stresin neden olduğu serbest oksijen radikali oluşumunu sadece yüksek plazma konsantrasyonlarında önleyebildikleri gösterilmiştir (50-52). Lidokain ise hangi plazma düzeyinde etkili olduğu konusu halen tartışmalı olmakla birlikte, hem in vitro hem de in vivo sistemlerde turnikeye bağlı iskemi-reperfüzyon hasarını azaltabileceği gösterilen tek lokal anesteziktir (53,54).

2.2. Oksidatif Stres

2.2.1 Serbest Radikaller

Dış yörüngelerinde bir ya da daha fazla paylaşılmamış elektron taşıyan serbest radikaller, birçok fizyolojik ve patolojik süreçte üretilebilen, oldukça aktif haldeki atom veya moleküllerdir. Oldukça kararsız olan bu moleküller, çevrelerindeki moleküllerle çabucak reaksiyona girme ve bu son yörünge elektronlarını paylaşma eğilimindedirler. Her tip kimyasal ve biyokimyasal tepkime, atomların dış orbitallerindeki elektronlar sayesinde gerçekleşir. Dış orbitallerde paylaşılmamış elektron bulunması serbest radikallerin reaktivitesini olağanüstü artırır, dolayısıyla serbest radikaller kimyasal aktifliği yüksek moleküllerdir (55). Oksijen (O₂) bütün hücrelere hiçbir zorlukla karşılaşmadan giren ve en çok kullanılma özelliğine sahip olan moleküldür. Radikal olmaya çok uygun olduğu için serbest radikal denince aslında serbest oksijen radikalleri, daha genel bir anlatımla Reaktif Oksijen Türleri (ROT) ifade edilmektedir. ROT ve serbest radikaller organizmada normal şartlar altında sürekli oluşmaktadır. Serbest radikaller pozitif yüklü, negatif yüklü ya da nötral olabilirler ve biyolojik sistemlerde en sık elektron transferi ile oluşurlar (56).

Radikal olmayan türler bu tepkimelerden herhangi biri oluştuğunda radikal haline gelir. Serbest radikaller ile radikal olmayanların tepkimeleri sonucu, tepkimeye giren moleküller sıra ile serbest radikallere dönüşür ve hasar zincirini ilerleterek yayarlar (57).

Organizmadaki serbest radikallerin en önemlisi ve büyük kısmı O_2 kaynaklı radikallerdir. Oksijenin toksik etkisi yoktur. Ancak aerobik hücre metabolizması sırasında serbest oksijen radikallerine dönüşür. Oksijenin kısmi indirgenmesinden, ROT arasında yer alan $\cdot OH$ ve $O_2^{\cdot -}$ oluşmaktadır. Ayrıca 1O_2 ve H_2O_2 molekülleri radikal olmayan reaktif oksijen türevleridir (58,59) (Tablo 3).

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot -}$); Oksijenin indirgenmesi ile oluşan ilk üründür. En önemli kaynağı mitokondriyal elektron transport zinciridir. [$O_2^{\cdot -}$]nin dokulardaki en önemli kaynağı, PMNL fonksiyonları sırasında üretilendir. Daha az miktarda olmakla birlikte eozinofil ve lenfositler de antibakteriyel bir ajan olarak $O_2^{\cdot -}$ üretirler. PMNL'lerde $O_2^{\cdot -}$ üretimi membran bağlı azalmış NAD(P)H-oksidad şantı veya heksoz monofosfat şantı yolu ile gerçekleşir (55,60).

$O_2^{\cdot -}$, $\cdot OH$ radikalinden daha zayıf reaktif özelliği olan bir molekül olmakla birlikte biyolojik dokulara zarar verebilir. Hücre hasarına neden olarak, aköz ortamda spontan bir biçimde H_2O_2 ve 1O_2 radikaline dönüşebilir.

LPO olarak bilinen serbest radikal zincir reaksiyonu, $\cdot OH$ radikalinin sebep olduğu en önemli hasardır. $\cdot OH$ radikalinin başlıca hedefi, hücre zarı su içermediğinden dolayı yağ asididir. Zar lipidlerinin peroksidasyonu zarın yapısını bozabilmekte ve geçirgenliğini artırıp hücre ölümüne sebep olabilmektedir (55, 61).

Singlet oksijen radikali (1O_2), gerçek bir radikal değildir. Çünkü eşleşmemiş elektron taşımaz. Oksijenin yüksek enerji ile uyarılmış formu olup biyolojik sistemlerde fotosentez reaksiyonları sırasında, dış yörüngesindeki bir elektronun enerjisinin değişmesi ve stabilitenin bozulmasıyla oluşur. Oksijenin kinetik olarak uyarılan bu formu, membran lipidleri ile oldukça yüksek reaktivite gösterir ve hücre membranındaki çoklu doymamış yağ asitleriyle (PUFA) reaksiyona girerek lipid peroksitlerin oluşumuna yol açabilmektedir (55,62).

H_2O_2 radikali enzimatik olarak Oksijenin iki elektron alarak indirgenmesiyle ya da $O_2^{\cdot -}$ radikallerinin enzimatik veya non-enzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özellik taşımaz, reaktif bir tür değildir. Güçsüz bir oksidan olmasına rağmen hücre membranlarından kolayca diffüze

olabildiği için ve ayrıca geçiş metalleriyle Fenton reaksiyonuna girdiği için hasar oluşturmada yüksek potansiyele sahiptir.

H_2O_2 , özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan Fe^{+2} ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki reaktif formlarını oluşturur. Ayrıca bu radikal birçok pro-enflamatuar sitokinin transkripsiyonundan sorumlu nükleer faktör kappa-B (NF- κ B)'nin oksidasyonunda rol oynar. H_2O_2 radikalinin uzaklaştırması hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan KAT ve peroksidaz enzimleri ile gerçekleştirilebilir (63-65).

Serbest radikaller, normal insan fizyolojisinde endojen kaynaklı olarak indirgenme-yükseltgenme (redoks) tepkimelerinde; mitokondriyal, endoplazmik ve nükleer elektron iletim sistemlerinde (Sitokrom P-450), peroksizomlarda, monosit ve nötrofillerin fagositozu gibi metabolik olaylar sırasında bol miktarda üretilir. Ayrıca bu moleküller hücre içerisinde ultraviyole ışınları, x ışınları gibi radyant enerjinin emilimi, hava kirliliği, sigara dumanı, parasetamol, nitrofurantoin gibi ilaçların kullanımı, solventler gibi çevresel faktörlerin etkisiyle eksojen kaynaklı olarak da oluşabilirler.

2.2.1.1. Serbest Radikallerin Biyolojik Etkileri

Antioksidan savunma mekanizması ve serbest radikaller arasındaki denge oksidanlar lehine bozulduğunda serbest radikaller; lipit, protein, karbonhidrat ve DNA gibi biyomoleküller ile etkileşerek hücrede yapısal ve metabolik değişikliklere neden olmaktadır (55,66).

1) Membran Lipitleri Üzerinde Etkileri: Serbest radikaller hücre komponentleri ile etkileşim içine girebilmeleri için hücre membranını geçmek zorundadır. Hücre zarı içerdiği PUFA nedeniyle oksidatif hasara oldukça duyarlıdır. Yağ asidi zincirinden serbest radikallerin etkisi ile hidrojen atomunun uzaklaşması, bu yağ asidi zincirinin de radikal özelliği kazanmasına neden olur. LPO, PUFA'nin radikaller ile oksidasyonu sonucu başlar, zincir reaksiyonları şeklinde devam eder ve sonucunda MDA, 4-hidroksinoneal (HNA), alkoller, etan ve pentan oluşur. LPO sonucu membran bütünlüğü bozulması ile membran proteinleri, reseptörleri ve ayrıca bunlara bağlanan enzimler inaktive olurlar (67).

2) *Proteinler Üzerinde Etkileri:* Serbest radikallerin etkilerine karşı proteinler, lipitlere göre daha az hassastırlar ve etkilenme dereceleri aminoasit içeriklerine bağlıdır. Serbest radikal atağı sonucu proteinlerde aminoasitlerin modifikasyonu, proteinlerin fragmantasyonu ve agregasyonu veya çapraz bağlanmaları gibi yapısal değişiklikler meydana gelmektedir. Böylece enzim, nörotransmitter ve reseptör proteinlerinin fonksiyonlarını bozabilir, immün sistemi uyarabilecek antijenik değişikliklere de yol açabilir.(68,69)

3) *Karbonhidratlar Üzerinde Etkileri:* Glükoz, mannoz ve deoksi şekerler ootoksidasyona uğrayarak, O_2^- ve H_2O_2 radikallerini oluştururlar. Monosakkaritlerin ootoksidasyonu çeşitli hastalıkların patogeneğinde önemli rol oynamaktadır (70).

4) *DNA Üzerinde Etkileri:* Serbest radikaller nükleik asit-baz modifikasyonlarına, nokta mutasyonlara, DNA çift sarmalının açılmasına, depürinasyona, çapraz bağlanmalara neden olabilir. Bu etkiler kromozomal mutasyonlar ve sitotoksisite ile sonuçlanır (58).

2.2.2 Antioksidanlar

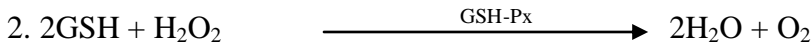
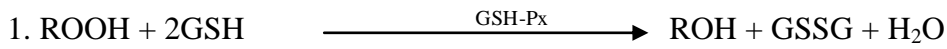
Nötrofil, makrofaj gibi immün sistem hücrelerinin savunma mekanizması için serbest radikal reaksiyonları gerekli olsa da serbest radikallerin fazla üretimi doku hasarı ve hücre ölümü ile sonuçlanmaktadır. Dolayısı ile serbest radikallerin tetiklediği oksidatif hasara karşı savunma mekanizmaları harekete geçer. Bunlar önleyici mekanizmalar, tamir mekanizmaları, fiziksel savunmalar ve antioksidan savunmalardır (55).

Antioksidan savunma; canlı hücrelerde bulunan protein, lipit, karbonhidrat ve DNA gibi oksitlenebilecek maddelerin oksidasyonunun önlenmesi veya geciktirilebilmesidir. Bu süreçte rol oynayan maddelere ‘antioksidanlar’ denir (71). Enzimatik antioksidanlar SOD, KAT ve GSH-Px enzimleridir. SOD’ın yapısında bakır, çinko ve manganez, GSH-Px’da ise selenyum iyonu bulunduğundan bu enzimler metaloenzim olarak da adlandırılırlar (64,70). Hücre içi ortamın aksine hücre dışı ortamda gerçekleşen, enzimatik olmayan antioksidan savunmadan ise E ve C vitamini, transferrin, seruloplazmin, albumin, bilürübin, β -karoten sorumludur. Hücre içi ortamın aksine hücre dışı sıvılarda enzimatik antioksidan sistemin aktivitesi sınırlıdır (71,72).

2.2.2.1. Enzimatik Antioksidanlar

Süperoksit Dismutaz (SOD): $O_2^{\cdot-}$ radikalinin H_2O_2 ve O_2 moleküllerine dönüşümünü katalizlemektedir. Metalloprotein olan SOD, hücrelerdeki $O_2^{\cdot-}$ düzeylerini kontrol etmede rol oynar. SOD, bir $O_2^{\cdot-}$ radikalini yükseltirken, diğer $O_2^{\cdot-}$ radikalini H_2O_2 'e indirger (73).

Glutasyon Peroksidaz (GSH-Px): Glutasyon yolunun ilk enzimidir, hidro- peroksitlerin indirgenmesinden sorumludur. Enzim aktivitesi, pentoz fosfat yolunda üretilen NAD(P)H'a bağımlıdır (74).



GSH-Px, üç peptidli glutasyonu kendi oksidize formuna (GSSG) oksidize ederken; sitozol ve mitokondrideki SOD tarafından üretilmiş olan H_2O_2 radikalini, yüksek spesifite göstererek ortadan kaldıracak özelliği gösterir (75).

Selenyum bağımlı ve selenyumdan bağımsız olmak üzere farklı substratlar kullanan iki tip GSH-Px vardır. Selenyumdan bağımsız formu organik H_2O_2 moleküllerini kullanıp yüksek bir aktivite gösterebilir. Selenyuma bağımlı olan formu ise sitoplazmada bulunur ve kapasitesi daha düşüktür (75).

Fagositik hücrelerde majör peroksit uzaklaştırıcı olarak görev yapan GSH-Px diğer antioksidanlarla birlikte, oksidatif patlama sırasında serbest radikal peroksidasyonu sonucu fagositik hücrelerin zarar görmesini engeller. Eritrositlerde de GSH-Px oksidatif strese karşı en etkili antioksidandır (74).

Katalaz (KAT): İçeriğinde Fe^{+3} bulunduran dört hem grubuna ayrılmış, glikoprotein yapısında bir hemoproteindir. SOD'nin oluşturduğu H_2O_2 'in peroksidazlarla beraber oksijen ve suya parçalanmasında rol alır (69).

2.2.2.2. Enzimatik Olmayan Antioksidanlar

Enzimatik olmayan diğer antioksidanlar şunlardır;

C Vitamini (Askorbik Asit), E Vitamini, A Vitamini, Karotenoidler, α -Lipoik Asit (LA), Ubikinonlar (Redükte Koenzim Q), Ürik Asit, Bilürübin, Albümin, Transferrin, Seruloplazmin.

2.2.2.2.1. E Vitamini (α -Tokoferol)

E vitamini yağda eriyen çok güçlü bir antioksidandır, en büyük biyolojik aktiviteye sahip olan, α -tokoferol formudur. Hücre zarı fosfolipitlerinde bulunan poliansatüre yağ asitlerini serbest radikal etkisinden koruyan ilk savunma hattını oluşturur. E vitamini, süperoksit ve hidroksil radikallerini, singlet oksijeni, lipit peroksit radikallerini ve diğer radikalleri indirger. Lipit peroksidasyonunun zincir reaksiyonu, E vitamini'nin zincir kırıcı etkisiyle sonlandırılabilir. Oluşturduğu bu koruyucu reaksiyonlar sırasında kendisi radikal formuna dönüşse de askorbik asit, glutatyon ve koenzim Q₁₀ (ubikinon) tarafından tekrar aktif haline döndürülür. E vitamini, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar; selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır.

2.3. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali

2.3.1. Hücre İçi Kalsiyum Sinyali ve Önemi

Hücrelerin işlevleri hücreSEL İYON DEĞİŞİMLERİ İLE tetiklenmektedir. Ca⁺² hem hücre içi süreçlerde hem de hücreler arası etkileşimde önemli görevlere sahiptir. Canlılarda gerçekleşen pek çok önemli olayda Ca⁺² belirleyici rol oynamaktadır. Bu olaylar arasında hareket, kalp atışı, beynin bilgiyi işleyip hafızayı oluşturması, yumurtanın dölleme sonucu aktivasyonu, pankreatik hücrelerde salgılama, yaraların iyileşmesi, karaciğer hücrelerinin davranışlarının düzenlenmesi ve apoptoz sayılabilir. Bu işlevlerde en önemli tetikleyici temel İYON, sekonder haberci olarak bilinen, Ca⁺² İYONUDUR. Hücre içi Ca⁺² sinyali, hücre içi Ca⁺² konsantrasyonunun ([Ca⁺²]_i) geçici bir şekilde artışından oluşur (76).

2.3.2 Hücre İçi Ca⁺² Sinyalinin Oluşumu

Endotel kaynaklı maddelerin sentezi veya salınımında Ca⁺² İYONUNUN gerekliliği indirekt araştırma yöntemleri ile belirlenmesine karşın moleküler mekanizmalar mikrospektro fluorometrik, elektrofizyolojik ve moleküler araştırma tekniklerin geliştirilmesi ile kısmen de olsa aydınlığa kavuşturulmuştur. Son yıllarda geliştirilen patch-clamp ve mikrospektrofluorometrik araştırma teknikleri ile beraber flüresan ışığına duyarlı çeşitli boyalar hücre içerisindeki İYONİK AKIMLARI ve hücre içi serbest İYON SEVİYELERİNİN ölçülmesini mümkün hale getirmiştir (76).

$[Ca^{+2}]_i$, hem hücre dışı ortama hem de hücre içinde Ca^{+2} depolayan yapılara göre çok düşük seviyededir. Bu nedenle Ca^{+2} 'un hücre içinde sinyal molekülü görevi yapabilir. Öyle ki hücre dışındaki $[Ca^{+2}]_o$ 'u yaklaşık olarak 10^{-3} M, Ca^{+2} depolarında, örneğin endoplazmik retikulumda (ER) 5×10^{-4} M civarlarında iken $[Ca^{+2}]_i$ bu değerlerden binlerce kez daha düşük olan 10^{-7} seviyelerindedir. Bu yüzden hem hücre içi ile dışı arasında, hem de ER ile sitoplazma arasında çok yüksek bir Ca^{+2} derişim farkı vardır. Bu fark Ca^{+2} için çok büyük bir sürdürücü kuvvet oluşmasına sebep olur. Hem hücre zarı hem de ER zarından Ca^{+2} geçişi bu sürdürücü kuvvetin etkisi ile protein yapıdaki kanallardan olur. Bu kanallar çoğunlukla kapalı durumda olup; voltaj, mekanik uyarı ya da ligand bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} geçirgenliği sağlarlar (77). Hücrenin işlevini etkileyen hücre içi serbest Ca^{+2} iyon artışı iki yolla oluşmaktadır (78):

Hücre dışından hücre içine kalsiyum girişi,

Hücre içi kalsiyum depolarından kalsiyumun salınması,

1-Hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişi sağlayan kanal tipleri şunlardır:

Voltaj Bağımlı Ca^{+2} Kanalları: Membran depolarizasyonu sonucu aktive olur. Bu aktivasyon kanalları Ca^{+2} 'a geçirgen hale getirir. Bu sayede hücre zarındaki elektriksel olaylar, hücre içindeki fizyolojik olaylarla çiftlenir (79).

Ligand Bağımlı Ca^{+2} Kanalları: Hücre dışından gelen ligandların bağlanması ile aktive olur ve Ca^{+2} 'a geçirgen hale gelirler. Bu kanallar aynı zamanda birer reseptör görevi görürler. Bu kanallara nikotinic Asetilkolin (ACh) reseptörleri örnek verilebilir (80).

Kalsiyumun Sızarak Hücreye Girdiği Kanallar: Bu kanalların aktivasyon mekanizması tam olarak bilinmemekle birlikte, hücre içi Ca^{+2} depoları, Ca^{+2} sinyali sonucu ya da daha farklı şekillerde boşaldığı zaman bu kanallar hücre dışından sitoplazmaya Ca^{+2} girişine sebep olurlar.

Na-Ca Exchange (değiş-tokuş) pompaları

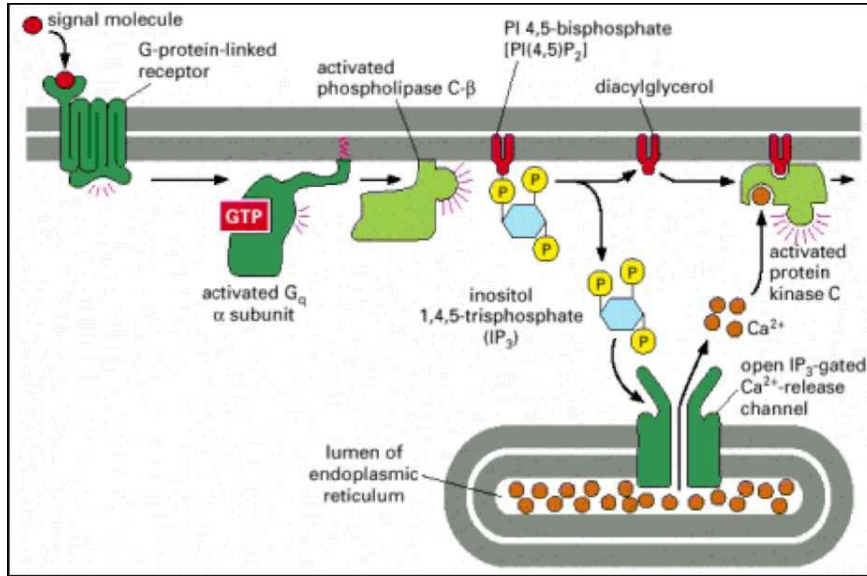
2- Hücre İçi Ca^{+2} Depolarından Ca^{+2} Çıkışını Sağlayan Yapılar

Ca^{+2} 'un hücre içi depolardan salınmasında Ca^{+2} ve inositol trifosfat (İP3) ile uyarılan reseptörler rol almaktadır. Hücre membranında bulunan reseptörlere agonistlerin bağlanması ile aktive olan G proteininin uyardığı fosfolipaz C (PLC), membran fosfolipitlerinde IP3 ve diaçilgliserol sentezine yol açmaktadır. Fosfatidil- inositol 4,5-

bifosfat (PtdIns 4, 5P₂) ve diaçilgliserol (DAG), protein kinaz C (PKC)'yi aktive ederek bir seri fosforilasyon ve bunu izleyen aktivasyon veya inaktivasyona neden olurken; IP₃ hücre içi depolardan heparinle bloke edilebilen Ca⁺² salınımını sağlamaktadır. Hücre içi serbest Ca⁺² artışının tetiklediği kalsiyum salınımı, pozitif geri-besleme mekanizması olarak iş görmektedir (Şekil 3).

Hücre içi depolara Ca⁺²'un alınması başka bir deyişle sitozolden Ca⁺²'un uzaklaştırılması üç yolla gerçekleşir:

- Endoplazmik retikulum (ER) membranındaki Ca-ATPaz enzim aktivitesinin artmasıyla ER'a Ca⁺² alımının artması.
- Hücre membranındaki Ca-ATPaz yardımıyla hücre dışına Ca⁺² atılması.
- Diğer ikisine oranla daha az olmak üzere Na-Ca "exchange" (değiş-tokuş) yardımıyla olmaktadır. Dinlenme durumunda hücre dışı kalsiyum iyon yoğunluğu, hücre içine oranla 10000-20000 kat daha yüksektir.



Şekil 3. GPCR (G Proteini Kenetli Reseptör) aracılı Ca⁺² sinyali (80)

2.4. Anestezi Türünün ve Anestezik Ajanın Seçimi:

Yapılacak işlem göz önüne alınarak diz artroskopisi lokal, reyonel veya genel anestezi altında yapılabilir (79,80). Anestetik madde seçimi ise hastanın tıbbi durumu ve yapılacak işlemin yanısıra hastanın, cerrahın ve anestezistin tercihi de göz önüne

alınarak belirlenebilir.

Lokal Anestezi: İntravenöz (İV) sedasyon sağlayarak veya sağlamaksızın lokal anestezi altında diz artroskopisi günümüzde oldukça sık kullanılır hale gelmiştir. Kullanılacak lokal anestetik maddenin seçimi, işlemin mali değeri ve operasyonun süresi göz önüne alınarak belirlenir. Yirmi dakikadan kısa sürmesi beklenen ve büyük bir cerrahi pencere gerektirmeyen operasyonlar İV sedasyonlu lokal anestezi için en uygun operasyonlardır. Bu girişimlere örnek tanısal artroskopi, klinik olarak kuşku duyulan kitlelerin çıkarılması ve parsiyel menisküsektomi sayılabilir. Geniş cerrahi gerektiren ve kemiğe de müdahale planlanan daha büyük cerrahi girişimlerde lokal anestezi iyi bir tercih değildir (81).

Rejyonel Anestezi: Spinal veya epidural anestezi gibi rejyonel anestezi teknikleri, işlemi izlemek isteyen hastalarda ve tıbbi durumları gereği genel anestezi alamayacak durumda olan hastalarda uygulanabilir. Birçok diz artroskopisi girişimleri rejyonel anestezi ile yapılabilir.

Genel Anestezi: Genel anestezi sık olarak tercih edilir. Çünkü genel anestezi altında yeterli cerrahi alan daha rahat sağlanabilir, tam kas gevşemesi elde edilir ve hasta turnike ağrısına maruz kalmamış olur. Çapraz bağ rekonstrüksiyonu gibi kemik üzerinde de işlem gerektiren ve bu nedenle uzun turnike süresi gerektirecek girişimlerde genel anestezi en uygun anestezi yöntemidir (82,83).

2.4.1. Genel Anestezi:

Genel anestezinin amacı amnezi, analjezi ve psişik-somatik reaksiyonları baskılayarak uygun cerrahi koşullar sağlarken, aynı zamanda da hastanın sağlığını ve güvenliğini devam ettirmektir. Genel anestezi uygulanırken inhalasyon, intravenöz veya her ikisinin kombine edildiği yöntemler kullanılabilir. Dengeli anestezide inhalasyon ve intravenöz yolla verilen ilaçlar birlikte kullanılır. Birkaç anestezi ilacın bu şekilde kullanılması tek tek ilaçların ihtiyacını azaltacak ve istenmeyen bazı etkilerin daha az görülmesini sağlayacaktır.

2.4.1.1. İnhalasyon Anestezikleri:

İnhalasyon anestezikleri genel anestezi uygulamasında en sık kullanılan ajanlardır. Oda ısısındaki durumlarına göre gaz veya sıvı şeklinde olabilirler:

- 1- *Gaz Formda Olanlar*: Dietil eter, trikloretilen, kloroform, siklopropan, azot protoksit, ksenon bu grupta yer alır.
- 2- *Sıvı Formda Olanlar*: Volatil anestezipler; halotan, enfluran, metoksifluran, izofluran, sevofluran ve desfluran bu grupta yer alır.

Anestezi Derinliği: Minimum alveoler konsantrasyon (MAC), 1 atmosfer basınç altında ağırlı bir stimulusa karşı oluşan cevabı, hayvanların veya insanların % 50'sinde ortadan kaldırmak için gerekli olan inhalasyon anestetik konsantrasyonudur. Gazın oksijen içindeki % volümünü gösterir. İnhalasyon anestezipleri bir buhar basıncı oluşturarak alveollere, daha sonra kana ve esas hedef organ olan beyne ulaşır. Beyinde belli bir parsiyel basınca ulaştığında ise anestezi etki ortaya çıkar (84).

Sevofluran: Solunum yollarında irritasyona yol açmadığı için özellikle çocuklarda anestezi indüksiyonu için iyi bir seçimdir. Serebral kan akımını ve intrakraniyal basıncı hafif artırır. Miyokardiyal kontraktiletiyi hafif deprese eder. Sistemik vazodilatasyon ve kan basıncında düşme, diğer ajanlarla karşılaştırıldığında göreceli olarak daha azdır. Tidal volüm, solunum sayısı ve ekspiryum sonu volümü en az etkileyen volatil anesteziptir. Düşük oranda metabolize olur, metaboliti olan florür seyrek olarak nefrotoksisiteye yol açar (84).

2.4.1.2. Nonopioid İntravenöz Anestezipler:

Genel anestezi indüksiyonunda anestezi idamesinde uygulanacak yöntemden bağımsız olarak İV anestetiklerin kullanımı tercih edilmektedir. İnhalasyon anestetikleri veya opioidlerle veya total intravenöz anestezi de kombine şekilde kullanılabilir.

İntravenöz anesteziplerin başlıca etkisi, doza bağlı olarak merkezi sinir sistemi depresyonu sonucu gözlenen sedasyon ve hipnozdur (85).

2.4.1.2.1. Diisopropilfenol - Disoprofol (Propofol)

1-2 diisopropilfenol yapısındadır. Propofol, suda erimediği için preparatları % 1'lik su-yağ emulsiyonu formundadır. Propofolün intravenöz uygulanması barbitürlara eşit bir hızda veya hafifçe daha yavaş olarak bilinç kaybına neden olur. Geri dönüş ise çok daha çabuk olur. Örneğin 2 mg/kg tek bir indüksiyon dozundan sonra 4.4 dakikada tam bir iyileşme görülür. Bu özelliğinden dolayı gününbirlik olgularda, küçük cerrahi girişimlerde tercih edilir. Propofol serebral kan akımını, oksijen tüketimini ve kafa içi basıncını azaltır. Fokal iskemide sodyum tiyopentale benzer koruyucu etki sağlar.

Kardiyovasküler sistemi deprese eder, doza bağımlı olarak kan basıncı ve kardiyak debiyi düşürür. İV uygulama sırasında irritasyon ve ağrıya neden olur, birlikte verilen opioidler veya lidokain ağrıya neden olur. Solüsyon bakteriyel üremeye uygundur. Propofol uygulamayı takiben kandan çok hızla elimine edilir. Eliminasyon yarı ömrü 55 dakikadır. Klerensi 3.5 L/dk dır. Karaciğerde inaktif metabolitlerine yıkılır ve büyük oranda idrarla atılır (85).

3. MATERYAL - METOD

3.1. Hasta-Kontrol Populasyonun Seçimi

Çalışma, araştırmaya gönüllü olarak katılan 20 hasta üzerinde uygulandı. Artoskopi amaçlı operasyona alınan ve çalışma sonuçlarını etkileyecek iskemi/reperfüzyon ve oksidatif stresle ilgili değerleri etkileyecek diyabet, inflamatuvar hastalıklar gibi problemi olmayan hastalar seçildi. Çalışmayı kabul eden hastalar araştırma hakkında ayrıntılı bilgilendirildi. Yazılı onayları alındı.

Çalışmaya katılan 20 hasta randomize olarak iki gruba ayrıldı. Hastalara premedikasyon uygulanmadı. E grubu olarak adlandırdığımız hastalara operasyondan 2 saat önce intramuskuler 300 IU E vitamini (D-Alpha-tocopherol acetat, Evigen, Aksu Firması İstanbul) uygulandı. N grubu olarak adlandırdığımız hastalar ise E vitamini preparatı uygulanmadı.

Tüm hastalardan operasyon öncesi bazal değerlerin belirlenmesi için venöz kan örnekleri alındı (E1 ve N1). Daha sonra hastalar operasyon odasına alındı ve standart monitörizasyon yapıldı. 3 mg/kg propofol, 2 mcg/kg fentanil ile induksiyonu takiben laringeal maske uygulandı. Anestezi idamesi O₂/Hava karışımı içinde sevofluran kullanılarak sağlandı. Operasyon bitiminde turnike açıldıktan 45 dk sonra tekrar kan alındı (E2 ve N2).

Tüm hastaların yaş, kilogram, operasyon süresi, turnike süresi ve turnike basınç değerleri kaydedildi. Sistolik (SAB), diastolik (DAB), ortalama arterial basınçları (OAB), kalp atım hızı (KAH), periferik oksijen saturasyon değerleri (SpO₂); bazal, anestezi induksiyonunda, ilk 20 dk içerisinde 5 dk aralar ile, sonrasında ise 10 dk aralar ile ölçüldü ve kaydedildi.

Hastalardan alınan venöz kan örneklerinde, toplam nötrofil sayıları Thoma lamı ve Türk eriyiği kullanılarak ışık mikroskopunda sayıldı. Sonra kan örneklerinden nötrofiller izole edildi. Nötrofillerin elde edilme (izolasyon) miktarlarına bağlı her biri 10⁷ hücre olacak şekilde kısımlara ayrıldı. PMN'lerin bir kısmı, lipid peroksidasyon (MDA, malondialdehit) düzeyleri ölçülmesi için donduruldu. MDA, GSH-Px ve indirgenmiş glutatyon (GSH) analizleri ise spektrofotometrik olarak yapıldı. PMN aktivasyonundaki erken etkileşimlerin belirlenmesi açısından önemli olan $\Delta[Ca^{+2}]_i$ değişiminin kinetik olarak izlenmesini saptamak için; kalan PMN'ler fMLP ile aktive

edilerek, izole edilip, Carry Eclipse fluorescence spectrophotometer cihazı ile hücre içi serbest kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ düzey değişimleri ($\Delta[Ca^{+2}]_i$) belirlendi.

Tüm olgulardan kan alımı benzer şartlarda ve aynı kişiler tarafından gerçekleştirildi. Kanlar uygun antikoagülan eklenmiş enjektörlerle alınıp kısa süre içinde çalışılmak üzere laboratuara ulaştırıldı. Daha sonra kanlar nötrofil izolasyonu bölümünde anlatıldığı şekilde santrifüj edilerek hücreler ve serum izole edildi.

3.2. Çalışmada Kullanılan Malzemeler ve Aletler

Soğutmalı santrifüj: Kubato (Japonya)

Santrifüj: Jouan B4İ (Fransa)

Derin dondurucu: Uğur (Türkiye)

Hassas terazi: Scaltec SPB 33 (İsviçre)

Vorteks: Nüve NM 100 (Türkiye)

Otomatik pipetler: Eppendorf (Almanya), Gilson (Fransa)

Spektrofotometre: Shimadzu UV 1601 (Japonya)

pH metre: Hanna Instruments (Portekiz)

Manyetik karıştırıcı: Nüve (Türkiye)

Florasana spektrofotometre (Carry Eclipsy Marka, Varian Firması, Avustralya)

CO₂ inkubator: Heal force (Japonya)

Laminar flow kabini: Javan (Belçika)

Sallamalı su banyosu: Labart (Japonya)

Pipet-Otomatik, (1 adet 0-1000 mikrolitre. 1 adet 0-200 mikrolitre): Fagus

50 l lik plastik falcon tüpleri, 1000/pk: Teknik

15 l lik falcon tüpleri, 1000/pk: Rota

1B-103 Borasilicated kapiller tüp, 1000/pk: Fagus

Ultrasantrifüj tüpü (şişmeli), MS-80 markalı santrifüj için, 2 ml. Sorvall-RotarTFT 80.2, 80000 rpm, kapakları ile birlikte: ABC

Ultrasantrifüj tüpü (şişmeli), MS-80 markalı santrifüj için, 35 ml. Sorvall-RotarTFT 80.2, 50000 rpm, kapakları ile: ABC

Hirschmann 0,1-200 ml şarjlı pipet Hirschmann pipettus akku: Fagus

3.3. Çalışmada Kullanılan Kimyasal Maddeler

N-Methyl-D-Glucamine, 100 gram 66930.

RPMI-1640 Medium 1x. Lot: 0384S, CAT:FG1215 500 ml.

Tripsin EDTA. Lot: 0248S Cat: L2163 100 ml.

Penicillin-Streptomycin-Gibco Cat No: 15070-063.

Cesium Hydroxide Monohydrate, 50 gram.

Hank's balanced salts solution. Cot: 02-015-1B Lot:803421.

Ficoll 400 Type 400 DL. 5 gram. F-8016.

Fura-2-AM invitrogen

3.4. Nötrofil İzolasyonu

50 ml hacimli steril bir şırıngaya, pıhtılaşmayı önleyici 7 ml ACD solüsyonu konuldu. İçerisine olgulardan alınan venöz kan çekildi. Bu kan içerisinde 10,5 ml eritrositleri çöktürmeye yarayan HES eklenerek; 50 ml hacimli iki adet falcon tüplerine eşit miktarda bölünerek hafifçe karıştırıldı. Sonra bu karışım 30 dk boyunca dik bir şekilde tutuldu. Bu arada iki tane vakumlu biyokimya tüpüne, serum elde etmek amacı ile yaklaşık 5'er ml kan alındı. 15 dk dik bir şekilde bekletildi. 15 dk sonunda 3000 rpm de 15 dk boyunca santrifuj edildi.

Elde edilen serum, steril 15 ml hacimli bir falcon tüpüne konuldu. SER + 1x Phosphate buffer saline (PBS) solüsyonu hazırlandı. (47,5 ml 1xPBS + 2,5 ml SER) 30 dk sonunda iki farklı tabaka gözlemlendi. Eritrositlerin tüpün dibine çökmüş olduğu saptandı ve yaklaşık 40 ml olan bu üst kısım (süpernatant) alınarak ayrı, steril bir 50 ml hacimli falcon tüpüne konularak 350 g'de 10 dk santrifuj edildi.

Santrifuj sonrası süpernatant tüpün dibinde az bir miktar kalacak şekilde atıldı ve tüpün dibindeki çökelti (pellet) bu az miktar sıvı ile tekrar çözülmeye çalışıldı. Bir konsantre PBS solüsyonu ile 40 ml hacme kadar tamamlandı ve tekrar 350 g'de santrifuj edildi. Bu işlem yukarıda yazıldığı şekilde bir kez daha tekrarlandı.

Tüpün dip kısmında kalan pelletin içerisinde az miktarda da olsa eritrosit kalmış olabileceği ihtimalinden dolayı pelletin üzerine hızlı bir şekilde 10 ml enjeksiyonluk steril su döküldü ve 30 saniye durmasına müsaade edildi. 30 saniye sonrasında 2 konsantre PBS solüsyonu konuldu. Son durumda 1 konsantre PBS olmuş oldu. Tekrar santrifüj işlemine götürüldü. Santrifüj sonrası kırmızı renkli bir solüsyon ve gri renkli pellet görülmesi beklendi. Bu pellet SER+1xPBS solüsyonu ile sulandırılarak çözüldü, ve santrifüj işlemi basamakları iki kere tekrarlandı. Steril 50 ml hacimli bir falcon tüpüne 15 ml Ficoll konuldu. Santrifüj işleminden çıkan pellet 10 ml SER+1xPBS ile tekrar sulandırıldı ve Ficoll solüsyonunun üzerine çok yavaş ilave edildi. 25 ml hacimli bu yeni solüsyonumuz 800 g'de 20 dk santrifüj edildi. Ficoll; santrifüj ve yoğunluğun etkisi ile sadece nötrofillerin tüpün dibine çökmesine izin verir.

Santrifüj sonrası supernatant atıldı ve tüpün dibindeki pellet tekrar SER+1xPBS ile sulandırıldı ve santrifüj işlemi basamağı iki kere tekrarlandı. Elde edilebilen hücre miktarına göre 10 ile 15 ml hacim arasında sulandırılırdı ve FURA-2 AM flüoresan maddesi ile son konsantrasyon 2 μ M olacak şekilde 37 °C de 45 dk boyunca sallamalı su banyosunda boyandı. Boyanma işleminden sonra fazla boyaların atılması için hücreler tekrar santrifüj ve yıkanma işlemine tabi tutuldular. Tampon solüsyonu içerisinde etrafi şeffaf plastik küvetlere konularak spektrofotometredeki yerine yerleştirilerek okunma işlemine geçildi.

Nötrofiller izolasyon miktarlarına bağlı her biri 10^7 hücre olacak şekilde kısımlara ayrıldı. Bütün örneklerin PMNL'lerin bir kısmı, oksidatif stresle ilgili değerlerin (GSH, GSH-Px, MDA düzeyleri) ölçülmesi için donduruldu. MDA (69) analizleri ise spektrofotometrik olarak yapıldı.

Kalan PMNL'ler fMLP ile aktive edilerek, izole edilip, carry eclipse fluorescence spectrophotometer cihazı ile hücre içi serbest kalsiyum $[Ca^{+2}]_i$ düzey değişimleri ($\Delta[Ca^{+2}]_i$) belirlendi. $\Delta[Ca^{+2}]_i$ değerinin kinetik olarak izlenmesi, PMNL aktivasyonundaki erken etkileşimlerin belirlenmesi açısından önemliydi. Daha sonra voltaja duyarlı Ca^{+2} kapıları, kalsiyum kanal blokörleri olan diltiazem ve verapamil ile bloke edildi. Bu kanalların bloke edilmesi, hem enflamatuar hastalıklarda yıkıcı nötrofil yanıtının azaltılması amacı ile bu kanalların kullanılabileceğini göstermekte, hem de PMNL aktivasyonlarında Ca^{+2} rolünün daha iyi anlaşılabilmesini sağlamaktadır.

3.5. Antioksidan Enzim Aktivitesinin Ölçümü:

3.5.1. GSH ve GSH-Px Analizleri

GSH düzeyleri Sedlak ve Lindsay'in bildirdikleri yöntemle göre spektrofotometre cihazı ile belirlendi. GSH tayini için gerekli solüsyonlar;

% 10 Trikloroasetik Asit (TCA) Solüsyonu

Tris Tamponu (0,4 M pH:8,9): 48.46 gr tris-hydroxymethyl-aminomethan'ın hidroklorik asit (HCl) ile pH 8.9 olacak şekilde 1 L'de çözülmesi ile hazırlandı.

İşlemin Yapılışı: 0.1 ml kan homejenatı 0.4 ml TCA solüsyonu ile karıştırıldı. 20 sn karıştırıcıda vortekslendi ve 3000 rpm de 5 dk santrifüj edildi. 0.1 ml süpernatant temiz bir tüp içine alındı. Üzerine 0.9 ml distile su, 2.0 ml Tris tamponu ve 0.1 ml DTNB solüsyonu eklendi. Oluşan sarı renk distile suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

GSH-Px enzim aktiviteleri Lawrence ve Burk tarafından bildirilen yöntemle göre spektrofotometrede belirlendi. Oda ısısında 5 sn beklendi. Saf suya karşı spektrofotometrede 412 nm dalga boyunda okundu.

Kullanılan kimyasallar

- 1- Tris HCl tamponu (50 mM) pH: 7.6
- 2- GSH solüsyonu
- 3- CHPO (cumene-hydroperoxide) solüsyonu
- 4- % 10 TCA solüsyonu
- 5- Tris tampon 0.4 M pH: 8.9
- 6- DTNB solüsyonu

Tablo 2. GSH-Px deneyinin analiz şeması ve kullanılan kimyasallar

Kimyasallar	Kontrol	Örnek
Nötrofiller	0.5 ml	0.5 ml
Tris HCl tamponu eklendi	0.3 ml	0.3 ml
CHPO ilave edildi	-	0.1 ml
GSH (her tüpe 5 sn aralıklarla konuldu)	0.1 ml	0.1 ml
<i>Oda ısısında tam 10 dakika beklendi</i>		
TCA (her tüp için 5 sn aralıklarla konuldu)	1.0 ml	1.0 ml
2500 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi		
<i>Üstteki süpernatant temiz bir tüpe alındı</i>		
Üzerine Tris Tampon eklendi	2.0 ml	2.0 ml
DTNB eklendi	0.1 ml	0.1 ml

3.5.2. Lipit peroksidasyon (MDA) Analizi

Nötrofillerde LP düzeylerinin belirlenmesi, Placer ve ark. bildirdikleri yönteme göre tiyobarbitürik asit (TBARS) reaksiyonu ile çok hassas bir spektrofotometrede (Schimadzu, UV-1800, Japonya) yapıldı (69).

İşlemin Yapılışı: Tüm nötrofil grupları 1/9 (2.25 ml) oranında TBARS solüsyonu ile sulandırıldı. Kör olarak ise 0.25 ml fosfat tamponu ile 1/9 oranında TBARS karışımı kullanıldı. Örnekler ve kör, 20 dakika süresince 100°C'lik kaynar su banyosunda tutuldu. Daha sonra çeşme suyu altında soğutuldu. 2500 devirde 5 dakika santrifüj edildi. Üstteki pembe renkli sıvı otomatik pipetle hassas bir şekilde alınarak 1 cm ışık geçişine sahip küvette 532 nm dalga boyundaki spektrofotometrede köre karşı okundu. Standart olarak ise yine aynı oranlarda hazırlanmış 1, 1, 3, 3 tetraethoxy propane solüsyonu kullanıldı. Değerler nanomol/gram protein olarak belirlendi.

3.6. İntrasellüler kalsiyumun ölçülmesi

Hücre içi Ca^{+2} miktarının ölçümü için nötrofil hücreleri oda ısısında 45 dakika boyunca 4 μ M fura-2 AM flüoresan boyası ile boyandı (76). Boyanma işleminden sonra yıkamaya tabi tutulan hücre manyetik olarak karıştırılan, şeffaf küvetlere hücre yoğunluğu 2×10^6 olacak şekilde Na^+ -HEPES [(mM cinsinden) NaCl, 140; KCl, 4,7; $CaCl_2$, 1,2; $MgCl_2$, 1.1; glukoz, 10 ve HEPES, 10 (pH 7.4)] solüsyonu içerisinde

florasan spektrofotometrede (Varian Cary Eclipse, Australia) haznesine yerleştirildi. Fura-2 AM için eksitasyon dalga boyları 340 nm ve 380 nm, 505 nm emisyon dalga boylarında flüoresan ışık ile uyarıldı ve yaklaşık 7 dakika boyunca kayıt alındı. Hücre içi serbest Ca^{2+} iyon düzeyi $[Ca^{+2}]_i$ değişimleri bilgisayar ekranında 340 nm/380 nm dalga boylarındaki uyarımları ile kaydedildi ve Grynkiewicz ve ark.'nın metoduna göre hesaplandı (75).

3.7. İstatistiksel Analiz

Bütün veriler ortalama \pm standart sapma [mean \pm standard deviation (SD)] olarak verildi. Nötrofil hücrelerinde çalışılan bilimsel değerlerin aritmetik ortalama değerleri arasındaki farklılıklar, SPSS for Windows 9.05 paket bilgisayar programı kullanılarak istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Gruplar arası fark olup olmadığı Mann-Whitney U testi istatistiksel analizi ile değerlendirildi. Tüm istatistiksel karşılaştırmalarda anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ den küçük olanlar anlamlı olarak kabul edildi.

Hastalarda bakılan akut faz reaktanları ve diğer laboratuvar testlerinin gruplar arasındaki farklılığını değerlendirmek için Kruskal-Wallis varyans analizi kullanıldı. Kruskal-Wallis testi önemli farklılaşma gösterirse, hangi grubun diğerinden farklı olduğu Mann-Whitney U testi ile araştırıldı. Anlamlılık düzeyi $p < 0.05$ kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmaya alınan 20 olgunun yaş, boy, vücut ağırlıkları açısından gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 3).

Hastaların yaşları 21 ile 51 arasında idi. Boy dağılımı 150 cm ile 187 cm arasındaydı. Kiloları ise 47 kg ile 107 kg arasında değişmekteydi.

Tablo 3. Grupların demografik özellikleri (Ort±SS)

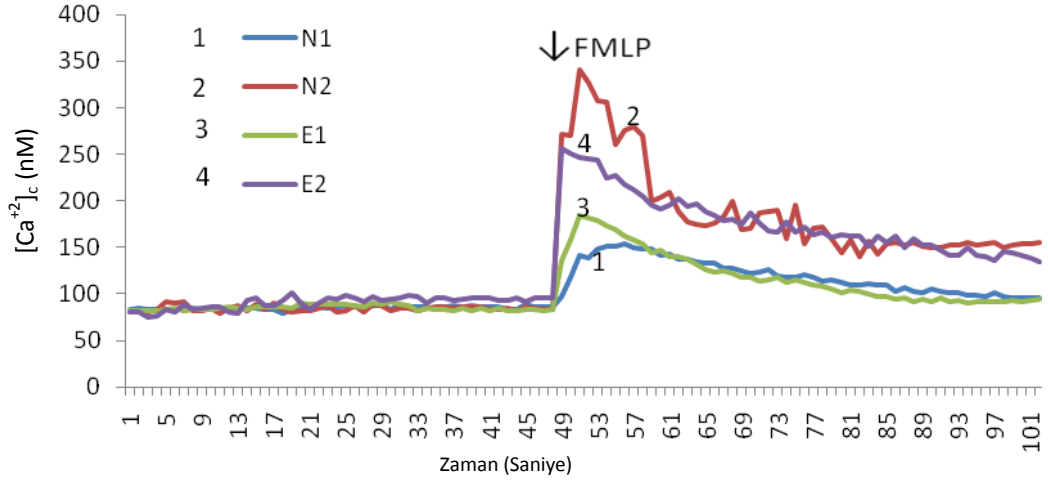
	Grup N (n=10)	Grup E (n=10)	p
Yaş (yıl)	37.10 ± 4.76	42.10 ± 2.88	0.165
Boy (cm)	167.60 ± 3.63	169.60 ± 2.88	0.684
Ağırlık (kg)	76.30 ± 10.19	84.30 ± 7.55	0.247
Anestezi süresi (dk)	63.40 ± 21.96	54.10 ± 16.51	0.436
Turnike süresi (dk)	41.60 ± 22.90	32.50 ± 11.74	0.529
Turnike basıncı (mmHg)	284.00 ± 20.11	277.00 ± 22.63	0.579

Gruplar arasında bazal hemodinamik değerlerde KAH, SAB, DAB, OAB, SpO₂ istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmadı (Tablo 4).

Tablo 4. Grupların ortalama hemodinamik değerleri (Ort±SS)

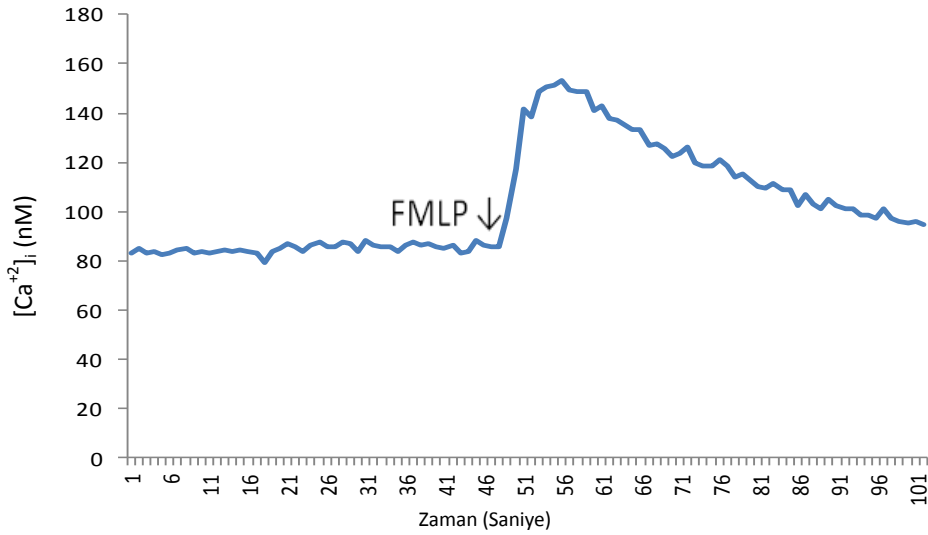
	Grup N	Grup E	p
KTA (atm/dk)	92.00±18.56	95.30±15.14	0.591
SAB (mmHg)	120.90±12.53	121.90±11.36	0.790
DAB (mmHg)	69.50±8.78	76.10±11.51	0.354
OAB (mmHg)	85.20±9.17	89.50±11.89	0.330
SpO₂ (%)	98.30±0.67	98.80±1.03	0.189

Tüm grupların preoperatif ve postoperatif nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyali analiz sonuçları şekil 4’te birlikte gösterildi.



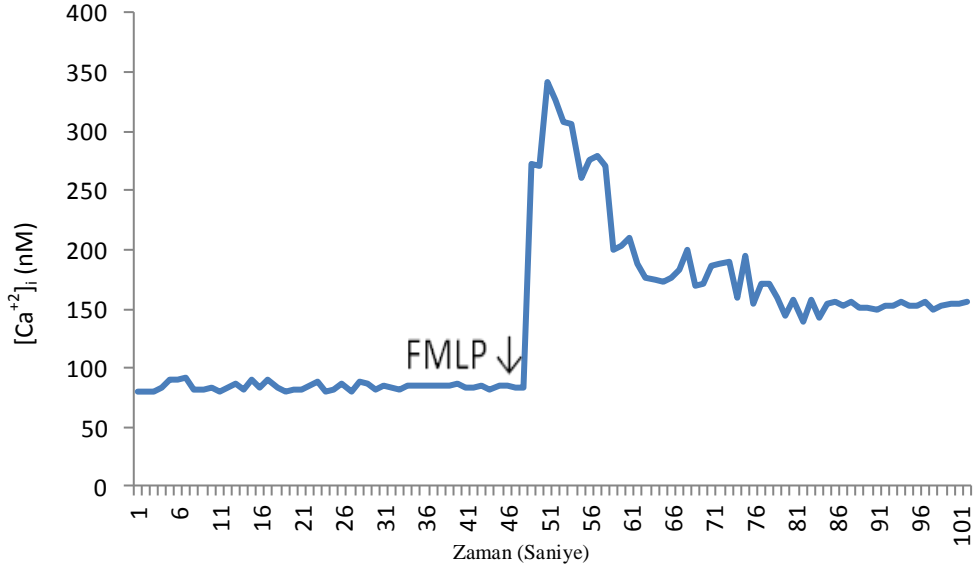
Şekil 4. Grupların preoperatif ve postoperatif periyottaki Ca^{+2} sinyali analiz sonucu

Grup N preoperatif nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyali analiz sonucu şekil 5’deki grafikte gösterildi.



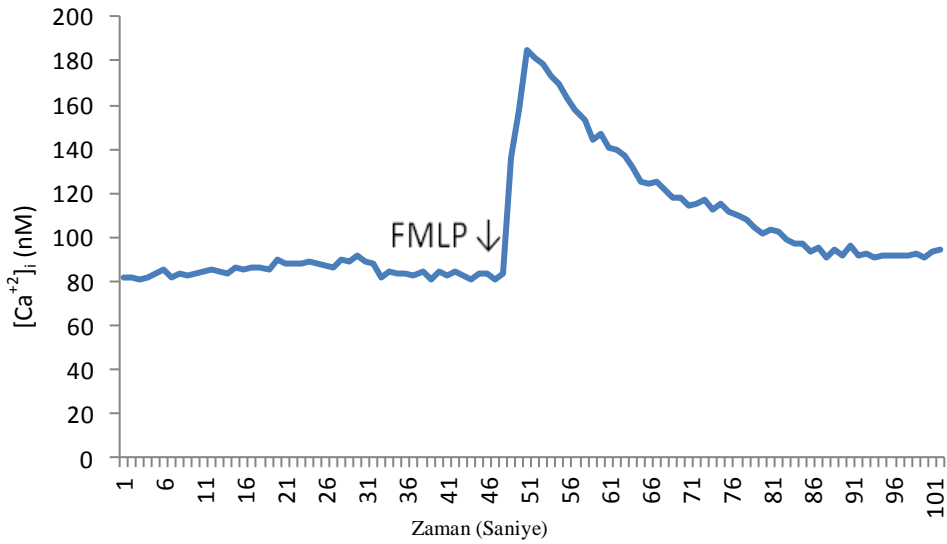
Şekil 5: Grup N preoperatif-N1 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu

Grup N postoperatif nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyali analiz sonucu şekil 6'daki grafikte gösterildi.



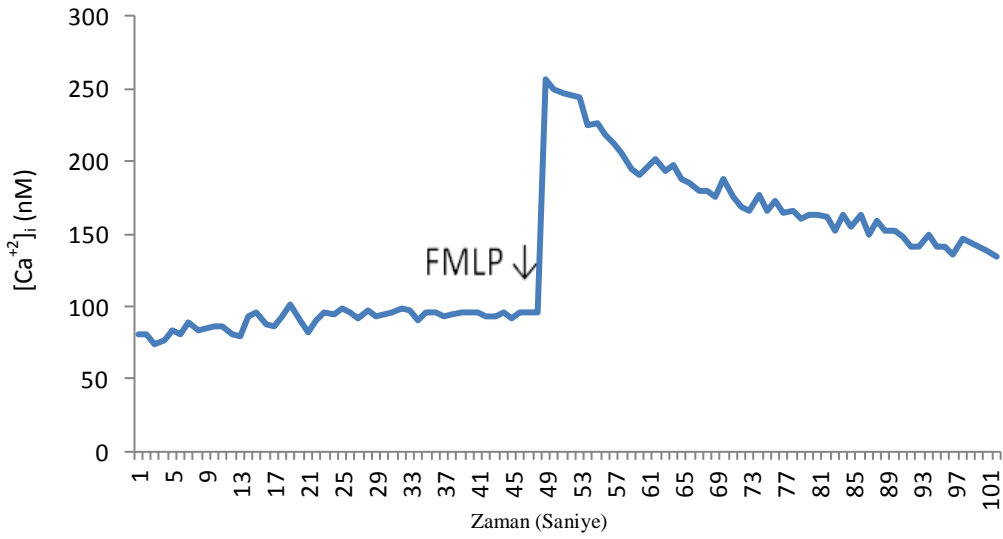
Şekil 6. Grup N postoperatif-N2 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu

Grup E preoperatif nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyali analiz sonucu şekil 7'deki grafikte gösterildi.



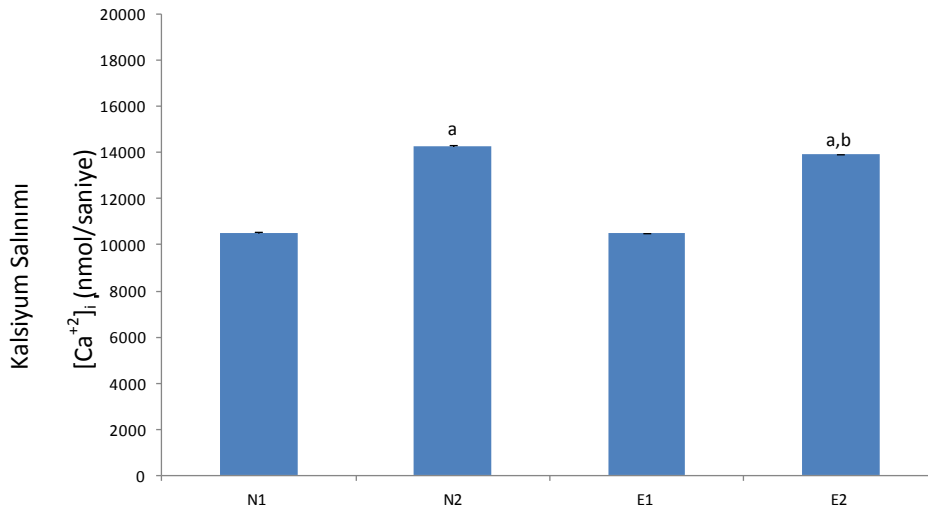
Şekil 7. Grup E preoperatif-E1 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu

Grup E postoperatif nötrofillerdeki Ca^{+2} sinyali analiz sonucu şekil 8'deki grafikte gösterildi.



Şekil 8. Grup E postoperatif-E2 Ca^{+2} sinyali analiz sonucu

Tüm grupların preoperatif ve postoperatif nötrofillerdeki Ca^{+2} salınımı şekil 9'daki sütun grafikte topluca gösterildi.



Şekil 9. Preoperatif ve Postoperatif Ca^{+2} Salınımı. (Ortalama \pm SS). ^a $p < 0.001$ ve preoperatif (N1 ve E1) gruplarına kıyasla. ^b $p < 0.05$ ve postoperatif (N2) grubuna kıyasla.

Dört grubun nötrofil kalsiyum iyon sonuçları Şekil 4'te gösterildi. Ayrıca nötrofil kalsiyum iyon sonuçları sütun grafiği olarak da Şekil 9'da gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde kontrol değerlerine oranla yani preoperatif, N1 ve E1 ortalamalarına kıyasla, iskemi reperfüzyon, yani postoperatif periyot N2 ve E2 periyodunda sitozolde

kalsiyum iyon akışının istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.001$) artmış olduğu belirlendi. Gruplar arasında N2 ve E2 periyodunda, yani E vitamini uygulanmayan postoperatif N2 ile E vitamini uygulanan postoperatif E2 grubu arasında istatistiksel fark gözlenmedi.

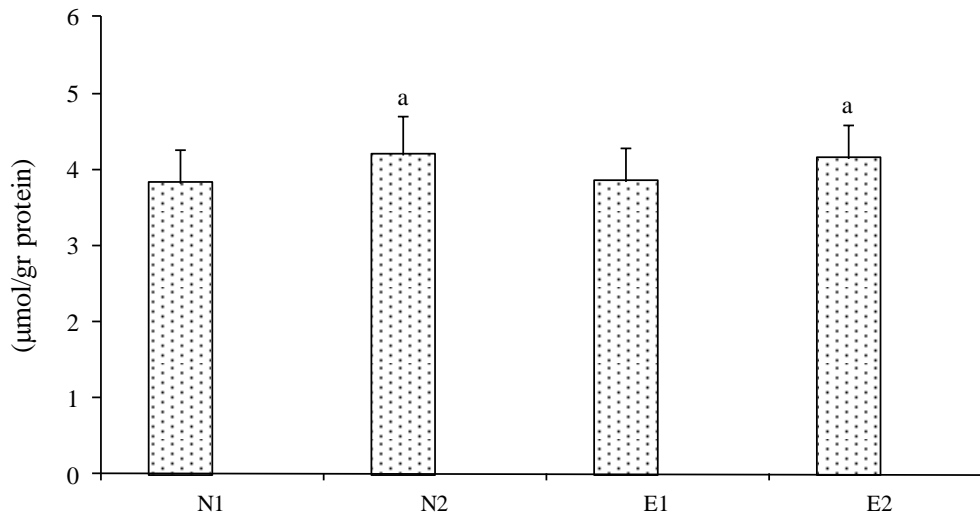
Olgularda nötrofil lipit peroksidasyon (LP), glutasyon (GSH) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) değerleri üzerinde E vitamininin etkileri Tablo 5’de gösterildi.

Tablo 5. Olgularda nötrofil lipit peroksidasyon (LP), glutasyon (GSH) ve glutasyon peroksidaz (GSH-Px) değerleri üzerinde E vitamininin etkileri. (Ortalama \pm SS).

Parameters	Preoperatif (N1)	Postoperatif (N2)	Preoperatif (E1)	Postoperatif (E2)
LP ($\mu\text{mol/g}$)	3.83 \pm 0.43	4.20 \pm 0.51 ^a	3.85 \pm 0.42	4.16 \pm 0.42 ^a
GSH ($\mu\text{mol/g}$)	1.88 \pm 0.17	1.61 \pm 0.14 ^b	1.76 \pm 0.31	1.93 \pm 0.16 ^{b,e}
GSH-Px (IU/g)	7.95 \pm 0.93	3.85 \pm 0.48 ^c	8.83 \pm 0.89	10.60 \pm 1.40 ^{c,e}

^a $p<0.05$, ^b $p<0.01$ ve ^c $p<0.001$ ve preoperatif periyoda kıyasla. ^d $p<0.05$ ve ^e $p<0.001$ ve postoperatif periyoda kıyasla

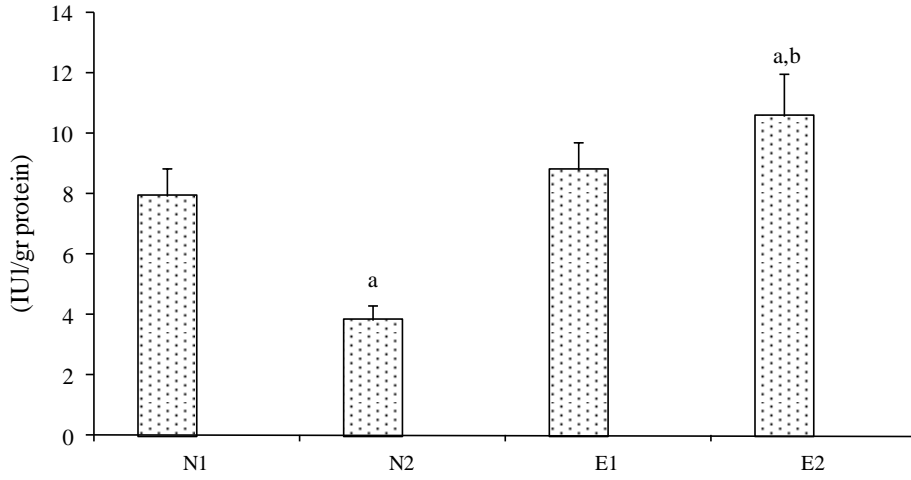
Olgularda nötrofil lipit peroksidasyon (LP) düzeyi üzerinde E vitamininin etkileri Şekil 10’da gösterildi.



^a $p<0.05$ ve preop (N1 ve E1) gruplarına kıyasla.

Şekil 10. Olgularda nötrofil lipit peroksidasyon (LP) düzeyi üzerinde E vitamininin etkileri (Ortalama \pm SS).

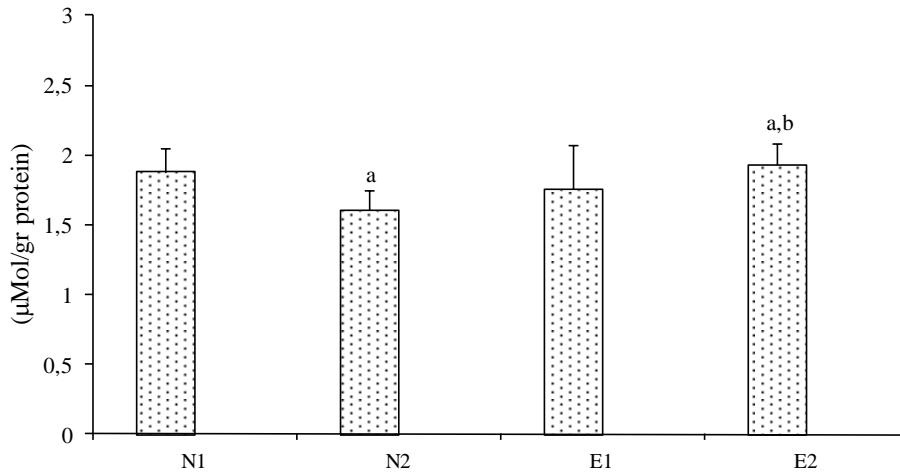
Olgularda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerinde E vitamininin etkileri şekil 11’de gösterildi.



^a $p < 0.001$ ve preoperatif (N1 ve E1) gruplarına kıyasla. ^b $p < 0.001$ ve postoperatif (N2) grubuna kıyasla.

Şekil 11. Olgularda glutatyon peroksidaz (GSH-Px) aktiviteleri üzerinde E vitamininin etkileri (Ortalama \pm SS).

Olgularda glutatyon (GSH) düzeyleri üzerinde E vitamininin etkileri Şekil 12’deki grafikte gösterildi.



^a $p < 0.01$ ve preoperatif (N1 ve E1) gruplarına kıyasla. ^b $p < 0.001$ ve postoperatif (N2) grubuna kıyasla.

Şekil 12. Olgularda glutatyon (GSH) düzeyleri üzerinde E vitamininin etkileri (Ortalama \pm SS).

Dört grubun nötrofil lipit peroksidasyon (LP), GSH ve GSH-Px sonuçları, Tablo 5'te gösterildi. Ayrıca nötrofil lipit peroksidasyon (LP), GSH ve GSH-Px sonuçları sütün grafiği olarak da sırasıyla şekil 10, 11 ve 12'de gösterildi. Bu sonuçlar incelendiğinde preoperatif (N1 ve E1) periyotlara kıyasla, iskemi reperfüzyon (N2 ve E2) sonrası periyotta sitozolde LP düzeylerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde ($p<0.05$) artmış olduğu belirlendi. Postoperatif (N2 ve E2) periyotta GSH ($p<0.01$) ve GSH-Px ($p<0.001$) değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu bulundu. E vitamini uygulanan postoperatif (E2) periyoduna göre, E vitamini uygulanmayan postoperatif (N2) periyodunda, LP değişmezken, GSH ve GSH-Px değerlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde ($p<0.001$) artış gözlemlendi.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan vücudunda karbonhidrat, protein ve yağların mitokondride değerlendirilmeleri ve fagositoz gibi fizyolojik olaylar ve iskemi, hemoraji, travma ve radyoaktivite gibi patolojik olaylar sırasında reaktif oksijen türleri ismi verilen ürünler meydana gelmektedir. Bunların başlıcaları; superoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit radikali (H_2O_2), hidroksil radikalidir (OH). Bu ürünler özellikle doymamış yağ asitlerinin yapılarını bozmaktadırlar. Bu radikalların zararlı etkilerinin dolaylı yoldan hücre düzeyinde belirlenmesinde kullanılan yöntem, malondialdehit (MDA) esasına bağlı lipid peroksidasyon (LP) düzeyi tayinidir.

Çalışmamızda lökosit lipid peroksidasyon (LP) düzeylerini inceledik. İskemi – reperfüzyon sonrası E vitamini kullanımının lipid peroksidasyon düzeylerine etkisini araştırdık. Sonuçlar incelendiğinde kontrol değerlerine oranla (N1 ve E1) iskemi reperfüzyon sonrası postoperatif periyotta (N2 ve E2) sitozolde kalsiyum iyon akışının istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.001$) artmış olduğu belirlendi. E vitamini uygulanmayan olguların postoperatif N2 period değerleri ile E vitamini uygulanan olguların postoperatif E2 periodu arasında istatistiksel fark gözlenmedi. Bu sonuçlara göre, iskemi reperfüzyon sonrası nötrofillerde lipid peroksidasyonda önemli düzeyde artış olduğu ve oksidatif stresin olduğu gözlemlendi. Literatürde iskemi/reperfüzyon sonrası serbest oksijen radikallerinin oluşumunun plazma ve dokularda arttığına dair yüzlerce çalışma olmasına rağmen, nötrofillerde sevofluran anestezisiyle birlikte iskemi/reperfüzyona maruz kalmanın araştırıldığı bir çalışma yoktur.

Oksidatif stres ürünlerinin vücuttaki zararlı etkilerinin önlenmesinde antioksidanlar rol oynamaktadır. Antioksidanları başlıca iki gruba ayırmak mümkündür. Birincisi enzimatik antioksidanlar olup superoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT) ve glutatyon peroksidaz gibi enzimleri içermektedir. SOD enzimi superoksit radikalini dismute ederek hidrojen peroksit üretmektedir. Görünüşte SOD zararlı bir iş yapıyor gibi görünmemektedir. Fakat KAT ve GSH-Px enzimleri hidrojen peroksiti suya parçalar. Yani SOD superoksit radikalini bu enzimlerin parçalayabileceği şekle dismute etmektedir. İkinci grup antioksidanlar enzimatik olmayan antioksidanlardır. Bu grup içerisinde başlıca yağda eriyen A, E vitaminleri ile beta karoten, C vitamini, ürik asit girmektedir. Örneğin, E vitamini yapısında bulundurduğu hidrojen iyonlarını hidroksil radikallerine vermekte ve bu sayede hidroksil radikallerini inhibe etmektedir. E vitamini

kendisi radikal haline dönüşmekte ve E vitamininden radikalleri C vitamini ile glutatyon (GSH) temizlemektedir. Bu sayede C vitamini ve GSH, E vitaminin rejenerasyonunu sağlamaktadırlar.

Bu tez çalışması sonuçları incelendiğinde grupların preoperatif (N1 ve E1) periottlarına kıyasla, postoperatif yani iskemi reperfüzyon sonrası periotta (N2 ve E2) sitozolde LP düzeylerinin istatistiksel olarak önemli düzeyde ($p<0.05$) arttığı belirlendi. Postoperatif periotta (N2 ve E2) gruplarında GSH ($p<0.01$) ve GSH-Px ($p<0.001$) değerlerinin istatistiksel olarak anlamlı düzeyde düşük olduğu bulundu. E vitamini uygulanan postoperatif (E2) grubuna göre E vitamini uygulanmayan postoperatif (N2) grubunda, LP değerleri değişmezken, GSH ve GSH-Px değerlerinde istatistiksel olarak önemli ölçüde ($p<0.001$) artış olduğu gözlemlendi.

Anestezik maddelerin antioksidan ve oksidan değerler üzerinde etkileri konusunda sınırlı çalışma vardır. Yakın zamanda, Ceylan ve ark. yaptıkları çalışmada desfluran anestezisi ile birlikte oral C ve E vitamini kombinasyonunun uygulanmasının azalan GSH-Px ve E vitamini düzeylerini artırdığı gözlemlenmiştir (86). Eroğlu ve ark desfluran anestezisi sonrası plazma E vitamini düzeylerinin azaldığını, oksidatif ürünlerin oluştuğunu gözlemlenmişlerdir (87). Çalışmanın LP, vitamin E ve GSH-Px sonuçları desfluran anestezisi sonrası oluşan oksidatif stresin varlığını desteklemektedir. Desflurana bağlı postoperatif komplikasyon insidansı sistemik oksidatif stresin varlığında artmaktadır. Vitamin C ve E alan hastalarda bu değişiklikler görülmektedir. Klinisyenler tarafından desfluran anestezisi öncesi C ve E vitamini desteği verilmesi komplikasyonlardan korunma açısından önerilmektedir. Tez çalışmamızda benzer sonuçlara ulaştık.

Oksidatif stres hücredeki çekirdekte ADP-riboz (ADPR) üretimini 3 yolla artırmaktadır. ADPR üretimi G proteine bağlı reseptörlerde ligand kanal aktivasyonu ile başlatılır. Reseptör aktivasyonu aynı zamanda intrasellüler Ca^{+2} yoğunluğunun yükselmesi IP_3 tarafından hücre içi organellerden Ca^{+2} serbest bırakılmasını sağlar. Voltaja duyarlı Ca^{+2} ve transient reseptör potansiyel melastatin 2 (TRPM2) kanalları hücreye doğru güçlenen TRPM2 aktivasyonu ile bir pozitif feed back ile Ca^{+2} girişi sağlar. Alternatif kaynaklar ADPR içeren mitokondri ve çekirdektir. ADPR polimerlerinin stimülasyon sonrası poli (ADPR) polimeraz-1 (PARP-1)'e ve sonrasında poly (ADPR) glikohidrolaz (PARG)

tarafından ADPR'ye hidroliz edilir (88). Bu olay hücreyi apoptozise gidinceye kadar uyurabilir.

Sitozolda Ca^{+2} artışı mitokondride depolarizasyon ve porların açılması veya hücre dışından sitozole H_2O_2 lerin gelişi daha fazla ROT üretilir. ADPR ve ROS geri bildirim mekanizması ile voltaja duyarlı Ca^{+2} kanalları ile TRPM2 kanallarının açılması yolu ile sitozole Ca^{+2} akışını artırır (89). Bu tez çalışmamızda gözlenen lipit peroksidasyon artışına paralel olarak sitozole Ca^{+2} akışının artması kendi arasında uyumluluk arz etmektedir. Artan oksidatif strese bağlı olarak bir kısım katyon kanallarının açılmasına bağlı olarak sitozole Ca^{+2} akışının artışına neden olmuş olabilir.

Propofol yüksek lipit çözünebilirliğine sahip bir anestezi ajan olduğundan, özellikle oksidatif hasara en duyarlı olan lipofilik membranlarda birikerek dokuların antioksidan kapasitesini artırabilmektedir (40,46). Propofolün sadece induksiyon dozunda veya rejyonel anestezide ilaveten sedasyon amacıyla kullanıldığında hasarı azaltacak yönde olumlu etkilerinin olup olmadığı konusu da araştırılmıştır. Bu amaçla Cheng ve ark. spinal anestezi altında turnike kullanılarak total diz protezi ameliyatı yapılacak olan hastalarda midazolamla kıyasla 0.2 mg.kg^{-1} dozda bolus yapıldıktan sonra $2 \text{ mg.kg}^{-1}\text{st}^{-1}$ 'den düşük dozda sedasyon amacıyla uygulanan propofolün hasarı anlamlı olarak azalttığını göstermişlerdir (47). Propofolün membranlarda birikici etkisi olmasına rağmen, sadece induksiyonda kullanılması infüzyon şeklinde devamlı kullanıma göre hasarı azaltmada etkin bulunmamış olup, operasyon boyunca devamlı infüzyonun önemi vurgulanmıştır (48). Çalışmamızda propofol sadece induksiyonda kullanıldığı için turnike açılmasını takiben reperfüzyon hasarını koruyucu özelliğinden yeterince yararlanılamamıştır.

Literatürde turnikenin neden olduğu mikrovasküler hasarı azaltmak için immüno supresifler, kortikosteroidler ve çeşitli antioksidanlar, hem klinik hem de deneysel çalışmalarda kullanılmıştır. Nötrofillerin bu hasarda, mekanizmadaki temel hücre olmasından dolayı, nötrofil aktivasyonu ve sekestrasyonunu önlemeye yönelik kullanılan immüno supresif ajanlar (FK 506 / Takrolimus) ve uzun etkili steroidlerle, kas hasarının azaltılabileceği ileri sürülmüştür (22,28). Enzim olmayan antioksidanlardan allopürinol (ksantin oksidaz inhibitörü), vitamin E (α -tokoferol), vitamin C, 21-aminosteroid, N asetil sistein, glutamin, karvedilol ve mannitol, turnikeye bağlı iskemi-

reperfüzyon hasarında kullanılmış, serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırarak sitoprotektif ve mikrosirkülasyonu düzenleyici özellikleri olduğu çeşitli çalışmalarla ortaya konmuştur (29-33). Ancak vitamin E'nin nötrofillerdeki Ca^{2+} iyonu üzerindeki etkisi ile yeterli çalışma yapılmamıştır. Farklı vitamin E dozları ile yapılacak yeni çalışmalar yararlı olacaktır. Turnike uygulanarak yapılacak tüm cerrahi işlemler öncesi iskemi-reperfüzyon hasarından korunmak için vitamin E uygulamasını öneriyoruz.

ÖZET

Sevofluran Anestezisi Altında Turnike uygulanan Cerrahi Artroskopi Olgularında E Vitamininin Nötrofillerde Kalsiyum Sinyali ve Oksidatif Stres Üzerine Etkileri

Bu çalışmada turnike uygulanan cerrahi artroskopi hastalarında oksidatif stresin etkisi, oksidatif strese yanıt olarak nötrofil sitozolüne kalsiyum iyonu akışının önemi ve preoperatif uygulanacak vitamin E'nin etkisinin araştırılması planlandı.

Polimorfonükleer lökositler (PMNL) inflamatuvar süreçte ana rolü oynayan hücrelerdir. Ca^{2+} sinyalinin oluşumunu sağlayan sitazolik Ca^{2+} konsantrasyonunda artış, nötrofil aktivasyonunda önemli bir basamağı oluşturmaktadır. Ca^{2+} sinyalizasyonu ve nötrofil aktivitesinde artış doku hasarına sebep olan reaktif oksijen radikalleri (ROS) oluşumunu indüklemektedir.

Çalışmaya belirli sağlık sorunu olmayan artroskopi yapılacak 20 hasta alındı. Tüm hastalardan preoperatif ve postoperatif kan örneği alındı. Grupların postoperatif periyotlarında nötrofillerde intrasitoplazmik Ca^{2+} düzeyleri ve oksidatif stres göstergeleri preoperatif değerlerine göre anlamlı derecede yüksek bulundu. İki grupta da nötrofillerde lipid peroksidaz düzeylerinde anlamlı fark bulunmazken, E vitamini uygulanan postoperatif E2 kan örneklerinde, GSH ve GSH-Px değerlerinde istatistiksel olarak önemli artış olduğu gözlemlendi ($p<0.001$). Turnike uygulanan hastalara operasyon öncesi E vitamini verilmesinin oksidatif stresten korumada yarar sağlayacağını düşünüyoruz.

Anahtar sözcükler: Vitamin E, oksidatif stres, nötrofillerde hücre içi Ca^{2+} sinyali, artroskopi.

SUMMARY

The effect of vitamin E on Ca^{2+} signal in neutrophils and oxidative stress in tourniquet performed patients under sevoflourane anesthesia

In this study, we aimed to investigate the effect of preoperatively administered vitamin E on oxidative stress parameters such as LP, GSH, GSH-Px, intracellular calcium release in neutrophils which were freshly isolated from surgical arthroscopy performed patients.

Polymorphonuclear leucocytes are the main role performing cells in the inflammatory process. The cytosolic Ca^{2+} concentration enhances that adequate the formation of Ca^{2+} signal constitutes an important step in neutrophil activation. The Ca^{2+} signalisation and the increase in neutrophil activation induce the reactive oxygen radicals formation that causes tissue damage.

Twenty healthy arthroscopy planned patients were included to the study. Intracellular Ca^{2+} levels and oxidative stress markers in the postoperative period were found significantly higher according to preoperative levels. Lipid peroxidation in neutrophils were not different between two groups while GSH and GSH-Px levels increased significantly in vitamin E supplied postoperative group ($p < 0.001$).

We think preoperative vitamin E supplementation is beneficial in tourniquet performed patients.

Keywords: Vitamin E, oxidative stress, Ca^{2+} signaling in neutrophils, arthroscopy.

KAYNAKLAR

1. Cushing H. Pneumatic tourniquets: with especial reference to their use in craniotomies. *Med News* 1904;84:577-80.
2. Sharrock NE, Savarese JJ. Anesthesia for orthopedic surgery. In: Miller RD, ed. *Anesthesia*. 5th ed. New York: Churchill Livingstone, 2000;2118-36.
3. Östman B, Michaelsson K, Rahme H ve ark. Tourniquet induced ischemia and reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Orthop* 2004;418:260-5.
4. Townsend HS, Goodman SB, Schurman DJ ve ark. Tourniquet release: systemic and metabolic effects. *Acta Anaesthesiol Scand* 1996;40:1234-7.
5. Messina LM, Faulkner JA. The skeletal muscle. In *Clinical Ischemic Syndromes*, ed. G. B. Zelenock. CV Mosby Co, Philadelphia, pp. 457-481, Chap 24, 1990.
6. Pedowitz RA. Tourniquet-induced neuromuscular injury. A recent review of rabbit and clinical experiments. *Acta Orthop Scand* 1991;245:1-33.
7. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002;10:620-30.
8. Gute DC, Ishida T, Yarimizu K ve ark. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Mol Cell Biochem* 1998;179:169-87.
9. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD ve ark. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg* 1990;12:8-15.
10. McCord JM. Oxygen derived free radicals in post ischemic tissue injury. *N Engl J Med* 1985;312:159-63.
11. Zingg JM, Meydani M, Azzi A. Alpha-Tocopheryl phosphate - An active lipid mediator? *Mol Nutr Food Res*. 2010 Feb 18. [Epub ahead of print]
12. Grisham MB, Granger DN. Metabolic sources of reactive oxygen metabolites during oxidant stress and ischemia and reperfusion. *Clin Chest Med* 1989;10:71-81.
13. Kharbanda RK, Peters M, Walton B ve ark. Ischemic preconditioning prevents endothelial injury and systemic neutrophil activation during ischemia-reperfusion in humans in vivo. *Circulation* 2001;103:1624-30.
14. McCord JM. The evolution of free radicals and oxidative stress. *Am J Med* 2000;108:652-9.
15. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free radicals in biology and medicine*. 3rd ed. New York: Oxford University Press, 1999:246-350.
16. Radi R, Beckman JS, Bush KM ve ark. Peroxynitrite-induced membrane lipid peroxidation: the cytotoxic potential of superoxide and nitric oxide. *Arch Biochem Biophys* 1991;288:481-7.
17. Grisham MB, Granger DN. Free radicals: reactive metabolites of oxygen as mediators of postischemic reperfusion injury. In: Martson A, Bulkley GB, Fiddian-Green RG, Haglund U, eds. *Splanchnic ischemia and multiple organ failure*. St Louis: Mosby, 1989:135-44.
18. Wakai A, Wang JH, Winter DC ve ark. Tourniquet-induced systemic inflammatory response in extremity surgery. *J Trauma* 2001;51:922-6.,
19. Hughes SF, Cotter MJ, Evans SA ve ark. Role of leukocytes in damage to the vascular endothelium during ischaemia reperfusion injury. *Br J Biomed Sci* 2006;63:166-70.
20. Barry MC, Wang JH, Kelly CJ ve ark. Plasma factors augment neutrophil and endothelial cell activation during aortic surgery. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 1997;13:381-7.
21. Lu X, Hamilton JA, Shen J ve ark. Role of tumor necrosis factor in myocardial dysfunction and apoptosis during hindlimb ischemia and reperfusion. *Crit Care Med* 2006;34:484-91.
22. Akgun S, Tekeli A, Isbir SC ve ark. FK 506 to prevent lung injury after hindlimb ischemia and reperfusion in a rat model: an electron microscopic study. *Surg Today* 2004;34:678-84.
23. Whetzel TP, Stevenson TR, Sharman RB ve ark. The effect of ischemic preconditioning on the recovery of skeletal muscle following tourniquet ischemia. *Plast Reconstr Surg* 1997;100: 1767-75.
24. Jerome SN, Akimitsu T, Gute DC ve ark. Ischemic preconditioning attenuates capillary no-reflow induced by prolonged ischemia and reperfusion. *Am J Physiol* 1995;268:H2063-7.

25. Akimitsu T, Gute DC ve Korthuis RJ. Ischemic preconditioning attenuates postischemic leukocyte adhesion and emigration. *Am J Physiol* 1996;271:H2052-9.
26. Eastlack RK, Groppo ER, Hargens AR ve ark. Ischemic-preconditioning does not prevent neuromuscular dysfunction after ischemia-reperfusion injury. *J Orthop Res* 2004;22:918-23.
27. Orban JC, Levraut J, Gindre S ve ark. Effects of acetylcysteine and ischaemic preconditioning on muscular function and postoperative pain after orthopaedic surgery using a pneumatic tourniquet. *Eur J Anaesthesiol* 2006;23:1025-30.
28. Bushell A, Klenerman L, Davies H ve ark. Ischemia-reperfusion-induced muscle damage: protective effect of corticosteroids and antioxidants in rabbits. *Acta Orthop Scand* 1996;67:393-8.
29. Novelli GP, Adembri C, Gandini E ve ark. Vitamin E protects human skeletal muscle from damage during surgical ischemia-reperfusion. *Am J Surg* 1996;172:206-9.
30. Mohler LR, Pedowitz RA, Ohara WM ve ark. Effects of an antioxidant in a rabbit model of tourniquet-induced skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *J Surg Res* 1996;60:23-8.
31. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE ve ark. Effect of low-dose N-acetyl-cysteine infusion on tourniquet-induced ischaemia reperfusion injury in arthroscopic knee surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 2005;49:847-51.
32. Prem JT, Eppinger M, Lemmon G ve ark. The role of glutamine in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury in the rat hind limb model. *Am J Surg* 1999;178:147-50.
33. Akbas H, Ozden M, Kanko M ve ark. Protective antioxidant effects of carvedilol in a rat model of ischaemia-reperfusion injury. *J Int Med Res* 2005;33:528-36.
34. Ricci MA, Graham AM, Corbisiero R ve ark. Are free radical scavengers beneficial in the treatment of compartment syndrome after acute arterial ischemia? *J Vasc Surg* 1989;9:244-50.
35. Perler BA, Tohmeh AG, Bulkley GB. Inhibition of the compartment syndrome by the ablation of free radical-mediated reperfusion injury. *Surgery* 1990;108:40-7.
36. Bulkley GB. Free radicals and other reactive oxygen metabolites: clinical relevance and the therapeutic efficacy of antioxidant therapy. *Surgery* 1993;113:479-83.
37. Nazıroğlu M. Molecular Mechanisms of vitamin E on intracellular signaling pathways in brain. In *Reactive Oxygen Species and Diseases*. Laszlo Goth (ed.). Research Signpost Press: Kerala, India, 2007;239-256.
38. Halliwell B. Oxidative stress and neurodegeneration: where are we now? *J Neurochem* 2006;97:1634-1658
39. Kahraman S, Kılınç K, Dal D ve ark. Propofol attenuates formation of lipid peroxides in tourniquet-induced ischaemia reperfusion injury. *Br J Anaesth* 1997;78:279-81.
40. Aldemir O, Celebi H, Cevik C ve ark. The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischaemia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anaesthesiol Scand* 2001;45:1221-5.
41. Schlack W, Preckel B, Stunneke D ve ark. Effects of halothane, enflurane, isoflurane, sevoflurane and desflurane on myocardial reperfusion injury in the isolated rat heart. *Br J Anaesth* 1998;81:913-9.
42. Lucchinetti E, Ambrosio S, Aquirre J ve ark. Sevoflurane inhalation at sedative concentrations provides endothelial protection against ischemia-reperfusion injury in humans. *Anesthesiology* 2007;106:262-8.
43. Murphy PG, Myers DS, Davies MJ ve ark. The antioxidant potential of propofol (2,6-diisopropyl phenol). *Br J Anaesth* 1992;68:613-8.
44. Kahraman S, Demiryurek AT. Propofol is a peroxynitrite scavenger. *Anesth Analg* 1997;84:1127-9.
45. Mathy-Hartert M, Mouithys-Mickalad A, Kohnen S ve ark. Effects of propofol on endothelial cells subjected to a peroxynitrite donor (SIN-1). *Anaesthesia* 2000;55:1066-71.
46. Runzer TD, Ansley DM, Godin DV ve ark. Tissue antioxidant capacity during anesthesia: propofol enhances in vivo red cell and tissue antioxidant capacity in a rat model. *Anesth Analg* 2002;94:89-93.
47. Cheng YJ, Wang YP, Chien CT ve ark. Small-dose propofol sedation attenuates the formation of reactive oxygen species in tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury under spinal anesthesia. *Anesth Analg* 2002;94:1617-20.

48. Turan R, Yagmurdu H, Kavutcu M ve ark. Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur J Anaesthesiol* 2007;24:185-9.
49. Saricaoglu F, Dal D, Salman AE ve ark. Ketamine sedation during spinal anesthesia for arthroscopic knee surgery reduced the ischemia-reperfusion injury markers. *Anesth Analg* 2005;101:904-9.
50. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K ve ark. Inhibitory effect of local anaesthetics on reactive oxygen species production by human neutrophils. *Acta Anaesthesiol Scand* 1997;41:524-8.
51. Mikawa K, Akamatsu H, Nishina K ve ark. Effects of ropivacaine on human neutrophil function: comparison with bupivacaine and lidocaine. *Eur J Anaesthesiol* 2003;20:104-10.
52. Lenfant F, Lahet JJ, Courderot-Masuyer C ve ark. Lidocaine has better antioxidant potential than ropivacaine and bupivacaine: in vitro comparison in a model of human erythrocytes submitted to an oxidative stress. *Biomed Pharmacother* 2004;58:248-54.
53. Naesh O, Haljamae H, Skielboe M ve ark. Purine metabolite washout and platelet aggregation at reflow after tourniquet ischemia: effect of intravenous regional lidocaine. *Acta Anaesthesiol Scand* 1995;39:1053-8.
54. Lan W, Harmon D, Wang JH ve ark. The effect of lidocaine on in vitro neutrophil and endothelial adhesion molecule expression induced by plasma obtained during tourniquet-induced ischaemia and reperfusion. *Eur J Anaesthesiol* 2004;21:892-7.
55. Knight JA. Review: Free radicals, antioxidants, and the immune system. *Ann Clin Lab Sci* 2000;30(2):145-58.
56. Seifried HE, Anderson DE, Fisher EI, Milner JA. A review of the interaction among dietary antioxidants and reactive oxygen species. *J Nutr Biochem* 2007;18(9):567-79.
57. Seifried HE, Anderson DE, Sorkin BC, Costello RB. Free radicals: the pros and cons of antioxidants. Executive summary report. *J Nutr.* 2004;134(11):3143-63.
58. Russell RC, Roth AC, Kucan JO, Zook EG. Reperfusion injury and oxygen free radicals: a review. *J Reconstr Microsurg* 1989;5(1):79-84.
59. Van Wijk R, Van Wijk EP, Wiegant FA, Ives J. Free radicals and low-level photon emission in human pathogenesis: state of the art. *Indian J Exp Biol.* 2008;46(5):273-309.
60. Leusen JH, Verhoeven AJ, Roos D. Interactions between the components of the human NADPH oxidase: a review about the intrigues in the phox family. *Front Biosci.* 1996;1:172-90.
61. Sharpe MA, Robb SJ, Clark JB. Nitric oxide and Fenton/Haber-Weiss chemistry: nitric oxide is a potent antioxidant at physiological concentrations. *J Neurochem.* 2003;87(2):386-94.
62. Khan AU, Kasha M. Singlet molecular oxygen in the Haber-Weiss reaction. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994;91(26):12365-7.
63. Gutteridge JM, Maitl L, Poyer L. Superoxide dismutase and Fenton chemistry. Reaction of ferric-EDTA complex and ferric-bipyridyl complex with hydrogen peroxide without the apparent formation of iron (II). *Biochem J* 1990;269(1):169-74.
64. Imlay JA, Chin SM, Linn S. Toxic DNA damage by hydrogen peroxide through the Fenton reaction in vivo and in vitro. *Science.* 1988;240(4852):640-2.
65. Winterbourn CC. Toxicity of iron and hydrogen peroxide: the Fenton reaction. *Toxicol Lett.* 1995;8283:969-74.
66. Halliwell B, Gutteridge JM, Cross CE. Free radicals, antioxidants, and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med.* 1992;119(6):598-620.
67. Morrow JD, Chen Y, Brame CJ, Yang J, Sanchez SC, ve ark. The isoprostanes: unique prostaglandin-like products of free-radical-initiated lipid peroxidation. *Drug Metab Rev.* 1999;31(1):117-39.
68. Gutteridge JM. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem.* 1995;41(12):1819-28.
69. Leutner S, Eckert A, Muller WE. ROS generation, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the aging brain. *J Neural Transm* 2001;108(8-9):955-67.
70. Quinlan GJ, Gutteridge JM. Hydroxyl radical generation by the tetracycline antibiotics with free radical damage to DNA, lipids and carbohydrate in the presence of iron and copper salts. *Free Radic Biol Med.* 1988;5(5-6):341-8.

71. Blokhina O, Virolainen E, Fagerstedt KV. Antioxidants, oxidative damage and oxygen deprivation stress: a review. *Ann Bot (Lond)* 2003;9:179-94.
72. Peskin AV. Cu, Zn-superoxide dismutase gene dosage and cell resistance to oxidative stress: a review. *Biosci Rep* 1997;17(1):85-9.
73. Greenwald RA. Superoxide dismutase and catalase as therapeutic agents for human diseases. A critical review. *Free Radic Biol Med* 1990;8(2):201-9.
74. Wallace SS. Biological consequences of free radical-damaged DNA bases. *Free Radic Biol Med* 2002;33(1):1-14.
75. Valko M, Rhodes CJ, Moncol J, Izakovic M, Mazur M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 2006;160(1):1-40.
76. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem* 1985;260(6):3440-50.
77. Alberts B, Johnson A, Lewis J. *Molecular Biology of the Cell: Fourth Edition*. Garland Publishing Inc 2002;1: 852-862.
78. Carafoli E. Intracellular calcium homeostasis. *Annu Rev Biochem* 1987;56:395-433.
79. Catterall WA, Perez-Reyes E, International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *Pharmacol Rev* 2005;57(4):411-25.
80. McKay BE, Placzek AN, Regulation of synaptic transmission and plasticity by neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *Biochem. Pharmacol* 2007;74(8):1120-33.
81. McGinty JB, Matza RA. Arthroscopy of the knee: Evaluation of an out-patient procedure under local anesthesia. *J Bone Joint Surg Am* 1978;60:787.
82. Yoshiya S, Kurosaka M, Hirohata K, Andrish JT. Knee arthroscopy using local anesthesia. *Arthroscopy* 1988;4:86-89.
83. Sapega AA, Heppenstall RB, Chance B, Park YS, Sokolow D. Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery: A biomechanical and ultrastructural study. *J Bone Joint Surg Am* 1985;67:303-314.
84. Ebert TJ, Schmid III FG. Inhalation anesthesia. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, editors. *Clinical Anesthesia*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.377-417,2001
85. Chiu JW, White PF. Non opioid intravenous anesthesia. In: Barash PG, Cullen BF, Stoelting RK, editors. *Clinical Anesthesia*. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p.327-343, 2001.
86. Ceylan BG, Nazıroğlu M, Uğuz AC, Barak C, Erdem B, Yavuz L. Effects of desflurane and vitamin C and E combination on element and oxidative stress levels in blood of operative patients. *Biol Trace Elem Res*. 2011;141:16-25.
87. Eroğlu F, Yavuz L, Ceylan BG, Yılmaz F, Eroğlu E, Delibaş N, Nazıroğlu M. New volatile anesthetic, desflurane, reduces vitamin E level in blood of operative patients via oxidative stress. *Cell Biochem Funct*. 2010;28: 211-216. I.F.1.651
88. Nazıroğlu, M. New molecular mechanisms on the activation of TRPM2 channels by oxidative stress and ADP-ribose. *Neurochemical Research* 2007; 32:1990-2001.
89. Nazıroğlu M. Role of selenium on calcium signaling and oxidative stress- induced molecular pathways in epilepsy. *Neurochem Res* 2009; 34:2181–91.