

**T.C.
SAĞLIK BAKANLIĞI
ANKARA EĞİTİM VE ARAŞTIRMA HASTANESİ
1. PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK CERRAHİ KLİNİĞİ**

**İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARININ ÖNLENMESİNDE
TADALAFİL'İN ETKİSİ
(Deneysel çalışma)**

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Oğuz KAYIRAN

Klinik Şefi: Prof. Dr. Uğur KOÇER

Ankara, 2008

ÖNSÖZ

Bu çalışmanın yürütülmesinde ve deneyin her aşamasında değerli yardımlarını esirgemeyen Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi 1. Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Kliniği'ne, Biyokimya Kliniği'ne, Patoloji Kliniği'ne, uygulama aşamasının gerçekleştirildiği Deney Hayvanları Ünitesi Araştırma Birimi'ne, beni büyütüp bugünlere getiren anneme ve babama, canım kardeşime ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim sevgili eşim Müge'ye teşekkürü bir borç bilirim.

Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi ihtisasına büyük bir şevk ile başladığım günden itibaren eğitim sürecimde elinden gelen çabayı gösteren, her koşulda bizlere en iyi olma yolunda teşvik eden ve destekleyen değerli hocam Prof. Dr. Uğur Koçer'e, iyi niyetini esirgemeyen hocam Doç. Dr. Gürcan Aslan'a, tez danışmanım ve sevgili ağabeyim Doç. Dr. Afşin Uysal'a, çalışmada emeğini esirgemeyen kardeşim Op. Dr. Suat Sedat Cuzdan'a ve diğer tüm değerli uzmanlarım ve asistan arkadaşlarıma, istatistik konusundaki yardımları için Klinik Psikolog Şehnaz Yıldırım'a ve Deney Hayvanları Ünitesi teknisyeni Öner Tüysüz'e teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Oğuz Kayıran

Ankara, 2008

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
1.Giriş.....	1
2.Genel Bilgiler	3
2.1. Cerrahi: İskeminin Tetikleyicisi.....	3
2.2. İskemi.....	4
2.3. Reperfüzyon.....	5
2.4. İskemi / Reperfüzyon Hasarı	5
2.4.1. İskemi / Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi.....	8
2.4.2. İskemiye Doku Cevapları.....	13
2.5. İskemik ‘Preconditioning’	15
2.6. ‘No-Reflow’ Fenomeni.....	15
2.7. Soğutmanın Doku Transferindeki Etkisi.....	16
2.8. Tadalafil (IC351, Cialis®)	16
2.9. Amaç.....	21
3.Materyal & Metod	22
3.1. Tadalafil.....	22
3.2. Deneysel Protokol.....	23
3.2.1. Cerrahi Yöntem.....	24
3.2.2. Biyokimyasal Analiz.	28
3.2.3. Histopatolojik Analiz.	29

3.2.4. İstatistiksel Analiz	30
4.Bulgular	31
4.1. Biyokimyasal Analiz	31
4.2. İstatistiksel Analiz	34
4.2.1. Total Nitrit	34
4.2.2. Malondialdehit	37
4.2.3. Miyeloperoksidaz	39
4.2.4. Sonuç	42
4.3. Flep Yaşayabilirlikleri	43
4.4. Flep Nekroz Alan Ölçümlerinin İstatistiksel Olarak Karşılaştırılması	45
4.5. Histopatolojik İnceleme.....	47
5.Tartışma.....	52
5.1. Sınıflandırma.....	56
5.2. Tadalafil.....	59
5.3. Fosfodiesteraz-5 İnhibitörlerinin Klinik Etkileri.....	60
6.Sonuç	66
7.Özet	67
8.Kaynaklar	68

1. GİRİŞ

İnsan vücudunun pek çok anatomik bölgesinde doğumsal olarak veya sonradan meydana gelen defektler, hem fonksiyonel hem de kozmetik açıdan uygun bir biçimde restore edilmelidir. Bu amaçla yapılan her türlü operasyonda, amaçlanan ortak noktalar; defektin tam olarak kapatılabilmesi, fonksiyonel ve biçimsel olarak eksik olan dokuya en çok benzeyen doku ile kapama sağlanmasıdır.

Trafik kazaları, iş kazaları, ateşli silah yaralanmaları ve cerrahi rezeksiyonlar gibi birçok nedenle insan vücudunda geniş doku kayıpları / uzuv kayıpları meydana gelmekte, hem anatomik hem de fonksiyonel olarak eksiklikler oluşmaktadır. Bu defektlerin onarımında en büyük sorumluluk, özelleşmiş bir branş olarak Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi'ye düşmektedir.

Günümüzde Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi için vücuttaki her vaskülarize yapı transfer edilebilir hale gelmiştir. Bu amaç doğrultusunda ve mikrocerrahi tekniklerindeki gelişmelere paralel olarak; kas, kas-deri, fasya-deri flepleri ve her türlü mikrovasküler kompozit doku transferleri sıklıkla gerçekleştirilen operasyonlar olmuştur. İyatrojenik olarak planlanmış serbest doku transferlerinde olduğu gibi veya çeşitli kazalar sonucu oluşan uzuv kopmalarında da insan vücudunun anatomik bir parçası vücuttan uzaklaşmakta ve kan akımı belirli bir süre için de olsa kesintiye uğramaktadır.

Canlı dokudaki aerobik metabolizmayı sürdürebilmek için gereken miktarda oksijen sağlanamamasına *iskemi* adı verilmektedir. Bir iskemi periyodu sonrasında, kesilmiş olan kan akımının tekrar sağlanması ise *reperfüzyon* olarak adlandırılmıştır. Kan akımı kesik olan dokunun tekrar dolaşımının sağlanması sonrası toksik etkili serbest oksijen radikalleri, dokuda *iskemi / reperfüzyon hasarı*'na yol açmaktadır. Gerek replantasyonu planlanan uzuv kopmalarında, gerekse mikrocerrahi ile yapılan serbest vaskülarize doku transferlerinde vücuttan uzaklaşan dokunun bir süreliğine kan dolaşımı kesilmektedir. Benzer durumlar, sebepleri değişken olarak organik bir patoloji veya iyatrojenik bir durumdan dolayı insan vücudu için hayati olan kalp,

beyin, böbrek, bağırsak gibi organlarda da gözlenmektedir. Tüm bu koşullarda doku veya organ kan akımı yeniden sağlansa bile özellikle serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu *iskemi / reperfüzyon hasarı* değişken seviyelerde hücre ve doku hasarına sebep olmakta ve fonksiyonel olarak kayıplar ile sonuçlanmaktadır.

2. GENEL BİLGİLER

Serbest doku transferleri veya replantasyon gibi mikrovasküler cerrahi girişimlerde, cerrahi sırasında zorunlu bir iskemi periyodu olmaktadır. Birçok olguda bu normotermik iskemi dönemi iyi tolere edilmekte ve özellikle serbest doku transferlerinde %90'ın üzerinde bir başarı sağlanabilmektedir (1). Normal şartlar altında bu zorunlu iskemi periyodu, 1.5 – 3 saat içerisinde sonlanmaktadır. Kompleks vakalarda veya komplikasyon gelişmesi halinde ise bu başlangıç iskemi periyodu uzamakta ve ikinci bir iskemik periyod başlamaktadır.

2.1. CERRAHİ: İSKEMİNİN TETİKLEYİCİSİ

Flep elevasyonunu takiben cerrahın vasküler pedikülü kesmesiyle birlikte *primer iskemi* periyodu başlamış olur. Aynı süreç amputasyon gibi uzuv kopmalarında da olayın gerçekleştiği andan itibaren başlamaktadır. Operasyon sürecinde anastomozlar yapıp mikrovasküler klempler alındığı andan itibaren de flebin veya replante edilen uzvun *reperfüzyonu* başlar. Eğer flep elevasyonu ve primer iskemik periyod problemsiz atlatılmış ise anastomoz sonrası vasküler akımın yerine gelmesi ile primer iskemi periyodunda oluşan geçici hasar geriye dönecektir. Kan akımında ikinci bir kesinti olur ise; doku, sekonder bir iskemi periyoduna girecektir. Müdahale erken dönemde gerçekleştirilir ve başarılı olursa dokuda, *ikinci reperfüzyon* dönemi başlayacaktır. Eğer ki bu olaylar problemlili bir hale gelmiş ise reperfüzyon, flep veya doku için ölümcül olabilir. Sekonder iskemi periyodu uzar veya tahmin edilemeyen iskemik ataklar gerçekleşirse flep kaybı veya replante edilen uzuv kayıp oranları da artmaktadır (2).

Flepler veya replante edilen uzuvlar sekonder iskemik periyodu, başlangıç iskemi periyodu kadar iyi tolere edemezler. Bu iskemi fazı esnasında rol oynayan temel faktörler; serbest oksijen radikalleri, nitrik oksit (NO), kompleman sistemi, lökositler ve endotel ve mitokondriden salınan faktörlerdir (2).

2.2. İSKEMİ

Bir dokunun veya sadece bir bölgenin besleyici kan akımının kesilmesi *iskemi* olarak tanımlanır. Bu, hasarın ilk fazıdır ve yetersiz oksijen alımı ve hücrel düzeyde metabolizmanın anaerobik yollara dönüşümü ile karakterizedir. *Kritik iskemi zamanı*, dokunun dolaşımı düzelene kadar canlı kalabileceği ve tüm iskemi periyodunu tolere edebileceği zaman olarak tanımlanır. *Ortalama kritik iskemi zamanı* ise iskemik periyod sonrası dokunun %50 kaybı ile sonuçlanan zaman dilimi olarak tariflenir (2).

Serbest doku nakillerinde flepler; kas, kemik, deri, fasiya, sinir veya bunların kombinasyonu şeklinde dokular içermektedirler. 1.5 – 3 saat arasında sonlanan zorunlu iskemi dönemi genellikle iyi tolere edilir. Ancak çok aktif metabolizması nedeniyle iskelet kasları, primer iskemiye daha hassas dokulardır. Primer iskemik periyodu kas flepleri, cilt flepleri kadar iyi tolere edemezler (3,4,5)

Serbest flep cerrahisinde 3 önemli iskemik durum sözkonusudur: 1)Flebin çok büyük boyutlarda dizayn edilmesi, 2)postoperatif arteriyel tromboz, 3)postoperatif venöz tromboz. Çok büyük boyutlarda kaldırılan fleplerde yetersiz beslenme nedeni ile özellikle flep distallerinde *kısmi* flep kayıpları gözlenebilmektedir. *Global* iskemi ise arteriyel veya venöz tromboza bağlı olarak tüm flepte gözlenir. Venöz global iskemi, eşit zamanlı arteriyel iskemiye göre dokulara daha fazla hasar oluşturmaktadır (6)

İskemi periyodunun uzunluğu veya kısalığı, oluşacak doku hasarı ile doğrudan ilişkilidir (7). İskemi periyodunda oluşan temel yapısal ve metabolik değişiklikler; kapillerlerin daralması, lökosit sekestrasyonu, endotel hücrelerinin metabolik disfonksiyonu, son-organ hücre membran disfonksiyonu ve inflamatuvar mediatörleri düzenleyen enzimlerde bozuklukların oluşmasıdır (8).

2.3. REPERFÜZYON

Kan akımı ve dolayısıyla oksijenizasyonu bozulmuş dokuda kan akımının yeniden sağlanması *reperfüzyon* olarak adlandırılır. Kan akımı tekrar restore edildiğinde iskemi sırasında oluşan biyokimyasal ve moleküler değişiklikler sonucu özellikle serbest radikaller aracılığı ile hasar ortaya çıkmaktadır (9 - 16). Bu toksik maddeler içerisinde en önemlileri; süperoksit anyon radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2) ve hidroksil radikali (OH^-) dir.

2.4. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

İskemi reperfüzyon hasarı, oksijenizasyonu bozulmuş dokuda kan akımının yeniden sağlanması sonucu oluşan bir dizi patofizyolojik değişikliklerdir. Bu hasarın mekanizmasında en önemli noktalar, hipoksiye maruz kalmış dokunun reperfüzyonu sırasında serbest oksijen radikallerinin ortaya çıkması ve inflamatuvar mediatörlerin ortama salınmasıdır (8).

Primer iskemik hasar, oksijenin yetersiz dağılımı ve kan akımındaki azalmaya bağlı olarak anaerobik metabolizma son ürünleri'nin ve toksik metabolitlerin birikimi sonucu ortaya çıkar. *Reperfüzyon* hasarında ise, serbest oksijen radikalleri; direkt veya hücrel antioksidan metabolizmaları etkisiz kılarak, doku hasarı oluşturmaktadır (8).

İskemi esnasında hücre içinde aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönüşür. Yüksek enerjili fosfatlar tüketilir ve hücre içinde laktat ve inorganik fosfatlar birikir. Hücre içindeki iyon dengesinin bozulmasına bağlı olarak asidoz gelişir. Diğer önemli bir patolojik mekanizma da iskemi esnasında hücre içine kalsiyum girişinin artmasıdır. Hücre içi kalsiyum artışına bağlı olarak endojen fosfolipazlar aktive olur. Bu da hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Membran bütünlüğünün bozulmasının en önemli sonucu hücre içerisinde bulunan antioksidan enzimlerin (Süperoksit Dismutaz, Katalaz, Glutatyon Peroksidaz) kaybı olarak ortaya çıkar. Bu etkiler sonrası hücre, serbest oksijen

radikallerinin etkisine daha da duyarlı hale gelir. Bu nedenledir ki; iskemi süresinin uzamasına paralel olarak reperfüzyon hasarının şiddeti de artmaktadır (1, 8).

Hem insanlarda, hem deney hayvanlarında hem de kültür sistemlerinde, akut hipoksik hasarda yapısal değişiklikler araştırılmış ve bu mekanizmalar şematize edilmiştir. Hipoksik koşullarda ilk etkilenen olay, mitokondriyal oksidatif fosforilasyonla sağlanan, hücrenin aerobik solunumudur. Adenozintrifosfat (ATP) yapımı giderek yavaşlar ve en sonunda durur. ATP kaybı hücrede birçok sistemi etkiler. Özellikle potasyumun diffüzyonla dışarı atılmasını ve sodyumun hücre birikimine sebep olan 'sodyum pompasının' yetersizliğine neden olacak ATPaz enzim aktivitesinin kaybı ile sonuçlanır. İyon tutulumu ile birlikte izoozmotik su tutulumu da meydana gelir ki bu, hücre şişmesi ile sonuçlanır. Hücrede ATP azalmasının diğer bir sonucu da hücre içinde adenozinmonofosfat (AMP) birikimidir. AMP'nin fazlalaşması, fosfofruktokinaz enzimini uyarır ki bu da glikoliz yolu ile glikojenden ATP sentezini uyararak hücreye enerji sağlar. Giderek azalan glikojen miktarı, 'periodic asid schiff' (PAS) gibi boyama yöntemleri ile histolojik olarak gösterilebilir. Glikolizin diğer bir sonucu da laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi sonrası hücre içinde inorganik fosfat birikmesi ve buna bağlı olarak da hücre içi pH'nın düşmesidir. Hücre içinde bunu izleyen olay; granüle endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılması, polizomların ve monozomların oluşmasıdır. Eğer hipoksi devam ederse membran geçirgenliği azalır ve hücre yüzeyinde lokal şişkinlikler oluşur. Bu evrede mitokondriler normal ya da hafifçe şişmiş veya yoğunlaşmıştır, endoplazmik retikulumlar genişlemiş ve tüm hücre belirgin olarak şişkin bir hal almıştır. Bu dönem 'geri dönüşümlü' dönemdir çünkü yeterli oksijenizasyon sağlanırsa tüm bu bulgular geri dönebilmektedir. Eğer iskemi devam ederse 'geri dönüşümsüz' hasar ortaya çıkacaktır. Geri dönüşsüz zedelenme morfolojik olarak; mitokondrilerde ileri derece vakuolizasyon, plazma zarlarının aşırı yıkımı, lizozomların şişmesi ile gelişir. Bu iskemik alan yeniden perfüze edilirse, hücre içine yoğun şekilde kalsiyum alımı olacaktır. Miyokard iskemisinde bu erken geri dönüşümsüz iskemi bulguları 30 - 40 dakikada ortaya çıkabilir. Sürekli olarak geçirgen membranlardan protein, temel koenzimler ve ribonükleik asit kaybı olur. Hücrede aynı zamanda yaşamını sürdürmek için gerekli olan ATP'nin yeniden

oluşturulmasında kullanılacak olan, hücre içi yüksek enerjili fosfatlar gibi metabolitlerini yitirir (1, 8 - 17).

Hücre içi pH'nın düşmesinin diğer bir sonucu da lizozom membranlarındaki parçalanmalardır. Bunun sonucunda enzimler sitoplazmaya geçer, asit hidrolazlar aktive olur. Hücre bileşenlerinin sindirimi başlar ki bu da ribonükleoprotein, deoksiribonükleoprotein ve glikojen kaybı ile sonuçlanır. Hücre ölümü sonrası hücre bileşenleri yıkılır ve hücre enzimleri hücreler arası mesafeye geçerler. Buna zıt olarak hücre dışı makromoleküller, hücreler arası mesafeden hücre içine girerler. Ölü hale geçen hücre, büyük fosfolipid kitlesi haline gelebilir. Bu oluşum ya diğer hücrelerce fagosite edilir ya da yağ asitlerine parçalanır. Yağ asidi artıklarının kalsifikasyonu, kalsiyum sabunlarının oluşumuna yol açar. Bu noktada normal dışı geçirgenleşmiş plazma membranından hücre içi enzimlerinin kaybı ve bunların seruma geçişi, hücre ölümünün en önemli bulgularıdır. Reperfüzyona rağmen yani hem kanlanmaya hem de oksijenlenmeye rağmen mitokondrinin işlevinin geri dönmeşi ve membran fonksiyonlarında belirgin bozuklukların oluşması, geri dönüşün mümkün olmayacağını gösterir (1, 8, - 17).

Serbest radikallerin iskemi / reperfüzyon hasarındaki rolü son zamanlarda belirginlik kazanmıştır. Serbest radikaller, oksijen varlığında serbest oksijen radikallerine dönüşür. Serbest oksijen radikalleri organel membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonuna neden olarak endoplazmik retikulum, mitokondriler ve diğer mikrozomal birimlerin hasarlanmasına yol açar (17).

Süperoksit; kararsız bir yapıya sahiptir, kendiliğinden oksijen ve hidrojen perokside dönüşür. Bu dönüşümün hızı, birçok hücrede bulunan süperoksit dismutazların katalitik etkisi ile artar. Glutasyon sentetaz, glutasyon peroksidaz, glukoz-6 fosfat dehidrogenaz ve katalazın içinde bulunduğu bir grup enzim de serbest radikallere karşı koruyucudur. Dismutazlar, süperoksitlerden H₂O₂ oluşturur. Bunlar da katalazlar ile oksijen ve suya parçalanır. Yapılan çalışmalarda süperoksit dismutazın iskemi / reperfüzyon hasarında koruyucu bir etkiye sahip olduğu, eksikliğinde oluşabilecek hasarın da dramatik bir biçimde artacağı öne sürülmüştür (18, 19).

2.4.1. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI'NIN PATOFİZYOLOJİSİ

2.4.1.1. İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARINDA NÖTROFİLLER

İskemi / Reperfüzyon Hasarı'nın en önemli mekanizmalarından biri nötrofil infiltrasyonudur. Nötrofiller postiskemik dokuları infiltre ederler; bunun sonucunda dolaşımda mevcut olan nötrofil sayısı azalır. Nötrofillerin postiskemik damarlara hücumunu önleyen antiadhezyon tedavinin, iskemi / reperfüzyon hasarını azaltıcı etkileri gösterilmiştir (20 - 23).

Aktifleşmiş polimorfonükleer nötrofillerden toksik oksijen türevleri açığa çıkmakta ve membran lipidlerinin peroksidasyonuna yol açmaktadır. Ayrıca aktifleşmiş polimorfonükleer nötrofillerin azurofil granüllerinden myeloperoksidaz (MPO) ve elastaz gibi birçok enzim açığa çıkmaktadır. MPO enzimi ile tahrip edici etkisi yüksek hipoklorik asit ve serbest oksijen ile indirekt olarak doku hasarına sebep olmaktadır. Elastaz ise proteolitik bir enzimdir ve mikrovasküler permeabiliteyi artırarak endotel hücresi ile ekstrasellüler matriks arasına polimorfonükleer nötrofil migrasyonuna yol açar (8).

Özetle, polimorfonükleer nötrofiller; **1)** elastaz gibi proteolitik enzimlerin sitoplazmik granüllerden sekresyonu (24), **2)** MPO gibi enzimlerin tetiklediği respiratuvar patlamalar ile serbest radikal üretimi (25, 26), **3)** kapiller düzeyde mikrosirkülasyonun obstrüksiyonu (27), **4)** iskeminin genişlemesi (28) gibi mekanizmalar aracılığıyla iskemi / reperfüzyon hasarında etkin olarak rol almaktadırlar. Klinik olarak bu olaylar kısmi veya total iskemi ile sonuçlanmaktadır.

2.4.1.2. İSKEMİ / REPERFÜZYON HASARINDA SİTOKİNLER

Sitokinler, polipeptid yapıda bir grup mediyatörlerdir. Birçok patofizyolojik olayda biyolojik etkileri vardır. İskemi sonrası reperfüzyonun çeşitli organlarda sitokin sentezi için majör bir tetikleyici olduğu gösterilmiştir (1, 8 - 17).

Tümör nekrotizan faktör (TNF) ve interlökin-1 (IL-1), polimorfonükleer nötrofillerin migrasyonuna neden olur. Ancak tek başına da TNF'nin respiratuar zinciri direkt olarak uyararak reaktif oksijen türevi serbest radikaller ve bunların metabolitlerini oluşturucu etkisi vardır. Vasküler endotelin nötrofil saldırısına karşı hassasiyetini arttırır. TNF'ye maruz kalan endotel hücreleri, inflamatuvar mediatörlerden IL-1 ve trombosit aktive edici faktör (PAF) salgılar. IL-1, makrofaj kökenli bir sitokindir ve septik şokta rol oynayan en önemli mediatördür. IL-1, TNF etkisi ile aktifleşmiş polimorfonükleer nötrofillerden salınmaktadır. Ayrıca, polimorfonükleer nötrofillerin inflame dokularda, damar dışına çıkmasını sağlayan en önemli ajandır (8 - 17).

Bu sitokinler, ayrıca endotel yüzeyinde adezyon moleküllerinin çoğalmasında da etkili olmaktadır. Lökositler, bu adezyon molekülleri aracılığı ile endotele yapışmakta ve ileri hasara neden olmaktadır. Yapılan çalışmalarda primer iskemi sonrası reperfüzyonda (ilk 24 saat) ve sekonder iskemi sonrası reperfüzyonda (ilk 24 saat sonrası), IL-1, TNF ve 'platelet derived growth faktör'ün (PDGF) arttığı ve yüksek seviyelerde seyrettiği gösterilmiştir (29, 30). İskemi / reperfüzyon hasarında 'transforming growth faktör - β da (TGF- β) kritik belirleyiciler arasındadır. Özellikle akut iskemi döneminde kan damarları ve fibroblastlarda artmakta ve koruyucu bir etkisi bulunmaktadır.

2.4.1.3. SERBEST RADİKALLER (REAKTİF OKSİJEN TÜREVLERİ)

Dış yörüngesinde tek sayıda serbest elektron bulunan, kimyasal olarak reaktif atom veya moleküllerdir. Organizmada "süperoksit" ve "hidroksil" gibi serbest radikallerin yanında, 'hidrojen peroksit' ve 'hipoklorik asit' gibi radikal olmayan ancak serbest radikal oluşturma potansiyeli bulunan zararlı oksijen türevleri de oluşabilmektedir. Bu yüzden son yıllarda 'serbest oksijen radikalleri' terimi daha çok kullanılır hale gelmiştir (1, 8, 17, 31, 32).

Reaktif oksijen türevleri, aerobik canlılarda belirli oranlarda oluşmaktadır. Fagositik hücrelerin yabancı mikroorganizmalara karşı savunma mekanizmalarında

önemli rol oynarlar. Serbest oksijen radikalleri, paylaşılmamış elektronlarından dolayı, protein, karbonhidrat ve nükleik asitlerle reaksiyona girerek bu moleküllerin oksidatif hasarına neden olurlar (31, 32) .

Serbest oksijen radikallerinin, hücre bileşenleri ile oluşturdukları reaksiyonlar özet olarak şunlardır (32):

- **Lipidler:** Serbest radikaller, hücre membranlarındaki kolesterol ve doymamış yağ asitleri ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyonunu başlatırlar. İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda; serbest oksijen radikalleri aracılığı ile oluşan lipid peroksidasyonunun hücre membranı için önemli yıkıcı etkileri olduğuna inanılmaktadır. Poliansatüre yağ asitleri membran bütünlüğünü bozmaktadır. Lipid peroksidasyonu; hücre membranının akışkanlığının ve geçirgenliğinin değişimine neden olur. Sonuçta membran proteinleri de degrade olur ve tüm bu süreç reperfüzyon hasarı sonucunda oluşan hücre ölümüne yol açan önemli etkenlerden sayılmaktadır (33). Lipid peroksidasyonunun doku ve plazmadaki son ürünü malondialdehittir (MDA) ve yapılan klinik ve deneysel çalışmalarda lipid peroksidasyonunun belirteci olarak yaygın olarak kullanılmaktadır (34–36).
- **Proteinler:** Serbest radikaller, aminoasitler ile reaksiyona girerek protein yapısındaki enzimlerin spesifik aktivitelerini ortadan kaldırırlar. Proteinlerdeki bağlanma ve enzim aktivitelerindeki farklılaşma hücrede fonksiyonel bozukluklara neden olur.
- **Karbonhidratlar:** Serbest radikaller, polisakkarit polimerizasyonunda artışa sebep olurlar. Glukoz gibi monosakkaritlerin oto-oksidasyonu sonucu hidrojen peroksit, diğer peroksitler ve oksialdehitlerin oluşması ile sonuçlanır.
- **Nükleik asitler:** Serbest radikaller, DNA zincirinde kırılmalar meydana getirirler. DNA hasarı sonrası aktive olan 'polimeraz' enzimi ile reaksiyona girerek, DNA'nın onarımına engel olurlar.

Süperoksit radikalinin ana kaynağı, postiskemik endoteldir. Normal koşullar altında süperoksidin zararlı etkileri, süperoksit dismutaz tarafından engellenir (19, 37, 38). Süperoksit dismutaz, süperoksidi hidrojen perokside dönüştüren bir enzimdir. Reperfüzyon esnasında bu doğal defans mekanizması bozulur. Böylece hidrojen peroksit, aminoasitler, membran transport proteinleri, sitokrom enzimleri ve nükleik asitlere oldukça zararlı olan hidroksil radikaline dönüşür (18, 39 - 42). Günümüzde iskemi / reperfüzyon hasarının azaltılmasına yönelik çalışmaların çoğu, bu serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi üzerine yoğunlaşmaktadır, ancak halen pratikte rutin kullanıma geçecek etkin bir madde bulunmuş değildir (43).

2.4.1.4. MİKROSİRKÜLASYON

Mikrovasküler sistem içerisinde en periferik kan dolaşımı “mikrosirkülasyon” olarak adlandırılır. Arteriol, venül, postkapiller venül ve kapilleri içeren bu mikrodamarların çapları 7-100 µm arasında değişmektedir (1).

Mikrocerrahi onarım sonrası klemplerin damardan serbestlenmesi ile dokuda mikrosirkülatuar düzeyde hemodinamik değişiklikler oluşmaktadır. Öncelikle geri dönen akım, başlangıçta yavaş bir seyir izler ki bu da lökosit aktivasyonu ve inflamatuvar cevabın başlamasına izin verir. İnflamasyon fazında en önemli patolojik durum, endotele lökosit yapışması ve bunu takip eden yoğun lökosit migrasyonudur. Siemionow ve arkadaşları mikrosirkülasyondan lökositlerin elimine edilmesinin, flep viabilitelerini artırdığını göstermişlerdir (1).

Her ne şekilde olursa olsun, mikrovasküler daralma ile sonuçlanan endotelial hücre hasarı; perfüzyon basıncının artışı, vazodilatör maddelerin salınımının azalması ve sızıntı yapan kapiller oluşumu ile sonuçlanır. Bu da mikrosirkülatuar yetersizlik ile sonuçlanır. Serbest doku transferlerinde bu ardışık olayların önüne geçilmesi için çaba harcanmaktadır.

2.4.1.5. NİTRİK OKSİT (NO)

Endotel, nitrik oksit (NO) için en önemli kaynaktır. Nitrik Oksit, iskemi / reperfüzyon hasarına karşı oldukça iyi bilinen mediyatör ve koruyucudur (44). Nitrik Oksit (NO), L-Arginin'in guanidyum grubundan, NO sentetaz enzimi aracılığı ile sentezlenen diatomik serbest radikaldir (41).

NO, *vasküler tonusun fizyolojik regülasyonu, platelet agregasyonunun inhibisyonu, endotele lökosit adezyonunun engellenmesi, oksijen derive serbest radikallerin temizlenmesi, normal vasküler permeabilitenin idamesi, düz kas proliferasyonunun engellenmesi, immün defansın güçlendirilmesi ve endotel hücrelerinin rejenerasyonu* gibi birçok fonksiyonda etken bir maddedir (45, 46). Etkilenmiş endotelyumda, NO salınımlarında ciddi bir disfonksiyonla karşılaşılır ise oluşacak iskemi / reperfüzyon hasarı artacaktır. Ancak halen NO sentezinin engellenmesinin mekanizması açık değildir (1).

2.4.1.6. KOMPLEMAN SİSTEMİ

İskemi esnasında oluşan olaylar zincirinde kompleman aktivasyonu tanımlanmış majör olaylardan birisidir. Kompleman sistemi 3 ayrı yoldan aktive edilebilir; **1.** klasik yol, **2.** lektin yolu, **3.** alternatif yol (47). Tüm bu yollar C3 ve C5 komplemanlarını kullanırlar ve sonuçta iskemi / reperfüzyon hasarının oluşmasında majör etkenlerden olduğu bilinen güçlü proinflamatuvar C5a ve C5b-9 komplemanları ortaya çıkmaktadır (47). İskemi / reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin aktivasyonunun rolü anlaşıldıkça, majör terapötik hedef olma yolunda çalışmalar giderek hız kazanmaktadır.

2.4.2. İSKEMİYE DOKU CEVAPLARI

2.4.2.1. DERİ

Deride enerji üretimi için anaerobik glikolitik yol kullanılmaktadır. Bu nedenle deri, anoksiye karşı dirençlidir. Anaerobik glikolitik yolda her mol glukoz için 2 ATP, trikarboksilikasit siklusunda, her mol glukoz için 32 ATP oluşur. Çok soğuk havalarda, kısıtlı oksijen varlığında; viabilite, anaerobik glikoliz ile sağlanır. Ayrıca, transplantasyon sırasında anoksi ve uzun iskemi sürelerini tolere edebilmesi de bu nedenledir (48).

2.4.2.2. KAS

Memelilerde kas dokusu anoksiye oldukça az dirençlidir. Derinin aksine aerobik glikoliz yolunu kullanır. Enerji üretimi için bu nedenle uzamış iskemi ve hipoksiye tolerans gösteremez. İskemi ve anoksi sonrası ya da ağır egzersiz sonrası tercihen glikolitik mekanizma kullanılır ve bazı metabolitler (laktik asit artışı, ekstrasellüler pH düşmesi) birikir; buna bağlı olarak kasta total iskemi sonrası iyileşme, büyük oranda gecikir. 6 saatlik bir iskemi sonrası iyileşme şüphelidir. Soğutma yapılsa bile 4 saat içinde reperfüzyon sağlanmaz ise nekroz ve sekonder enfeksiyon gelişim riski artar (49).

2.4.2.3. KEMİK & KIKIRDAK

Dinlenme aşamasındaki kondroblastlar ve osteoblastlar, hipoksinin etkilerine daha dirençlidir. Aksine, iyileşen dokudaki aktif proliferasyon gösteren fibroblastlar, hipoksiye çok fazla duyarlıdır (50).

2.4.2.4. VASKÜLER ENDOTEL

Vasküler endotel, trikarboksilik asit siklusunun (Trikarboksiasit siklusu, Krebs döngüsü) aerobik metabolizmasını kullanmaktadır. Endotel hücreleri, kısa süreli hipoksi ve anoksi dönemlerine çok fazla duyarlıdır. Yalnızca 2-5 dakikalık anoksi, geri dönüşümsüz değişikliklere neden olabilmektedir. Prostatiklin seviyesi düşer, trombositlerdeki tromboksan A₂ bu durumdan etkilenmez. Damar duvarındaki bağ dokusu ve düz kas, anoksiye endotel hücrelerinden daha duyarlıdır. Transplantasyon ve replantasyon cerrahisi sırasında, uzamış anoksi sırasında canlı kalır ve yeniden sağlanan kan akımı için fonksiyonel görev yapabilir. Yeterli kan akımı sağlanabilirse, prostatiklin eksikliği ile tromboksan A₂ fazlalığı önemini kaybeder. Sonuçta endotel hücreleri rejenere olabilmektedir (50).

2.4.2.5. PERİFERİK SİNİR

Önemli olan, hipoksi veya anoksi sonrası akson yaşamı olmayıp mezenşimal destek dokusunun yaşamıdır. En duyarlı sinir bölgeleri, nöromuskuler birleşme alanlarıdır. 8 saatten fazla süren iskemi ve hipoksi süresi, geri dönüşümsüz değişiklikler yaratır (50).

2.4.2.6. GASTROİNTESTİNAL (GİS) SİSTEM

2-4 saat iskemiden sonra iyileşme mümkündür. 4 saatten fazla uzamış iskemi süresinde kalıcı değişiklikler oluşmaktadır. Bağırsakların proksimal kısmı, distal kısmından daha fazla sıcak iskemiyeye dayanıklıdır. Soğutma ile aerobik metabolizmayı azaltmak, iskemi süresini uzatır (50).

2.5. İSKEMİK “PRECONDITIONING”

İskemik preconditioning, geniş iskemi / reperfüzyon hasarı beklenen dokularda koruma ve hasarı azaltma amaçlı isteyerek yapılmış kısa iskemi periyodlarını içerir (51). Bu planlanmış kısa iskemi periyodları ve reperfüzyon epizodları sayesinde doku veya organ, maruz kalınacak gerçek iskemiyeye daha dirençli hale getirilir. İlk önce kalp için tasarlanan bu prosedür daha sonra diğer organlar için de düşünülmüştür (52,53). Literatürde iskemik preconditioning'in koruyucu etkilerinin özellikle miyokard için denendiği birçok rapor mevcuttur (54 - 57).

2.6. “NOREFLOW” FENOMENİ

'*No Reflow*' fenomeni iskemi / reperfüzyon hasarının bir sonucudur. Bu hasar yukarıda bahsettiğimiz mekanizmalar ile oluşur ve ortaya çıkan sonuç 'no reflow'dur. İlk kez 1967'de iskemik dokuların reperfüzyonuna rağmen besleyici kapiller yetmezliği şeklinde tanımlanmıştır (8, 58, 59, 60). Birçok teori öne sürülmekle birlikte halen *intravasküler hemokonsantrasyon* teorisi en popüler olanıdır. Bu teoriye göre kapiller permeabilitenin artışı ile birlikte intravasküler mesafeden sıvı kaybı gerçekleşmekte ve kapiller düzeyde hematokrit artışı olmaktadır. Bu da kanın reostatik özelliğini bozmaktadır. Preoperatif dönemde hematokritin düşürülmesinin iskemi / reperfüzyon hasarını azalttığını gösteren çalışmalar bu teoriyi desteklemektedir (8).

'No Reflow' fenomenini açıklamaya yönelik ikinci bir teori de endotelial hücrelerde oluşan şişmedir. Hücreler hipoksik kaldıkça şişmekte ve özellikle hücre membranı pompa fonksiyonlarında yetmezlik oluşmaktadır. Bu da, damar lümeninin daralması ve kan akımına karşı yüksek bir rezistans oluşumuna neden olmaktadır. Diğer üçüncü bir teori de kapillerlerin lökositler tarafından tıkanmasıdır. Özellikle postkapiller venüllerde gözlenen lökosit tıkaçları da bu teoriyi güçlendirmektedir (8, 60).

Bu mekanizmalar tek tek veya birarada gerçekleşerek interstisyel mesafede sıvı basıncını arttırmakta ve mikrosirkülasyonun devamı için yüksek bir ekstrasvasküler kompresyon oluşmaktadır. İnterstisyel mesafedeki ödemi azaltmaya yönelik çalışmalar iskemi / reperfüzyon hasarını azaltıcı etkiler doğurmuştur (60).

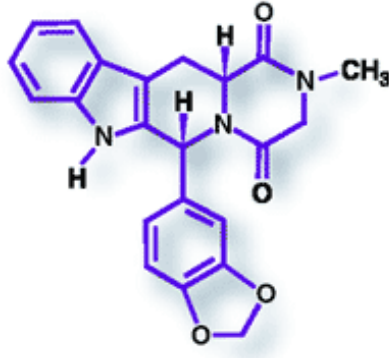
2.7. SOĞUTMANIN DOKU TRANSFERİNDEKİ ETKİSİ

Mekanizması tam olarak anlaşılamamakla birlikte dokularda soğutma, iskemiye olan toleransı arttırmaktadır. Bunun sebebi olarak kademeli olarak yapılan soğutma işleminin iskemiye maruz kalan dokunun metabolizmasını yavaşlattığı, metabolik gereksinimlerinin azaldığı ve iskeminin böylece daha uzun süre tolere edilebildiği düşünülmektedir. Kademeli soğutma uygulanan çalışmalarda reperfüzyona bağlı hasarın daha az olduğu öngörülmektedir (61,62,63)

2.8. TADALAFİL (IC351, CIALIS®)

Tadalafil, erkek erektil disfonksiyonunda (ED) oral yoldan kullanılan bir ajandır. Cialis® (Lilly ICOS LLC) ticari adıdır. Sarı renkli, film kaplı, badem şeklindedir ve 5, 10, 20 miligramlık dozlarda üretilmektedir.

Formülü $C_{22} H_{19} N_3 O_4$ olan tadalafilin Uluslararası Temel ve Uygulamalı Kimya Birliği'ne göre açık adı (6*R*-trans)-6-(1,3-benzodioksol-5-il)-2,3,6,7,12,12a-hekzahidro-2-metil-pirazino [1',2':1,6] pirido [3,4-*b*] indol-1,4-diondur ve moleküler ağırlığı 389,404 g/moldür (Şekil 2.1)(64-66).



Şekil 2.1. Tadalafilin kimyasal yapısı

Farmakokinetik özelliklerine bakıldığında biyoyararlanımı değişkenlik göstermekte, %94 oranında proteine bağlanmakta ve 17,5 saat yarı ömrü (67) bulunmaktadır. Yalnızca oral yoldan kullanılan tadalafil karaciğerde sitokrom p450 (CYP3A4) tarafından metabolize edilmekte ve %60 dışı, %30 idrar ile atılmaktadır. Bundan dolayı karaciğer ve böbrek yetmezliği olanlarda dikkatli kullanılmalıdır. Ayrıca CYP3A4 enziminin güçlü inhibitörleri olan ritanovir, ketokonazol ve itrakonazol gibi ajanlarla kullanılırken dozaj maksimum 10 mg.da tutulmalıdır.

Tadalafil, priapisme neden olabileceğinden orak hücreli anemi, multipl myelom ve lösemi gibi hastalığı olanlarda ve penisin anatomik deformasyonu (açılanma, kavernoza fibrozis, Peyronie hastalığı) gibi rahatsızlığı olanlarda dikkatle kullanılmalıdır.

Tadalafil, fosfodiesteraz-5 enzim inhibisyonu yaparak etki göstermektedir. En belirgin avantajı 17,5 saat gibi uzun bir yarı ömre sahip olmasıdır. Diğer fosfodiesteraz-5 selektif inhibitörleri olan sildenafil (Viagra®) ve verdenafil (Levitra®) 4-5 saat yarı ömürlüdür. Bundan dolayı günde bir tane alınması yeterlidir.

Fosfodiesteraz-5 enzimi, vücutta sistemik arter ve venlerin düz kaslarında yaygın olarak bulunmaktadır. Bundan dolayı da enzim inhibisyonu çeşitli etkilere neden olabilmektedir (Tablo 2.1).

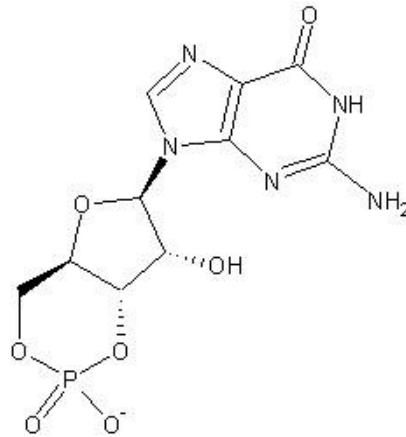
Tablo 2.1. Fosfodiesterazların dokudaki dağılımları ve fonksiyonları (cGMP: siklik guanozin monoosfat, cAMP: siklik adenozin monofosfat)

Fosfodiesteraz izoenzimi	Aracı	Doku dağılımı	Fonksiyon
Fosfodiesteraz-1	cGMP ve cAMP	Beyin, kalp, iskelet kası, karaciğer, damar ve visseral kaslar	Vasküler kas gevşemesi, tat, koku
Fosfodiesteraz-2	cGMP ve cAMP	Adrenal korteks, korpus kavernozum, kalp, beyin, damar ve visseral kaslar	Koku, adrenokortikosteroid
Fosfodiesteraz-3	cGMP ve cAMP	Korpus kavernozum, kalp, beyin, damar ve visseral kaslar, trombosit, karaciğer, böbrek, yağ dokusu	Miyokard kasılması, insülin salınımı, lipoliz, glukoz üretimi, trombosit agregasyonu
Fosfodiesteraz-4	cAMP	Beyin, testis, tiroid bezi, böbrek, akciğer, mast hücresi, iskelet ile damar ve visseral kaslar	İnflamasyon, damar ve visseral kas tonusu, depresyon, tiroid bez salgısı, trombosit agregasyonu
Fosfodiesteraz-5	cGMP	Korpus kavernozum, trombosit, damar ve visseral kaslar, kalp, plasenta, pankreas, beyin, karaciğer, akciğer	Ereksiyon, düz kas tonusu, trombosit agregasyonu, biliş
Fosfodiesteraz-6	cGMP	Retina	Görme için sinyal iletimi
Fosfodiesteraz-7	cAMP	İskelet kası, kalp, lenfosit	T-hücre aktivasyonu, iskelet kası, metabolizma
Fosfodiesteraz-8	cAMP	Testis, over, bağırsak	T-hücre aktivasyonu
Fosfodiesteraz-9	cGMP	Dalak, ince bağırsak, beyin	-
Fosfodiesteraz-10	cGMP ve cAMP	Beyin, testis, tiroid bezi	Dopamin sinyal iletimi
Fosfodiesteraz-11	cGMP ve cAMP	İskelet kası, kalp, damar ve visseral kaslar, hipofiz, testis, karaciğer, böbrek	-

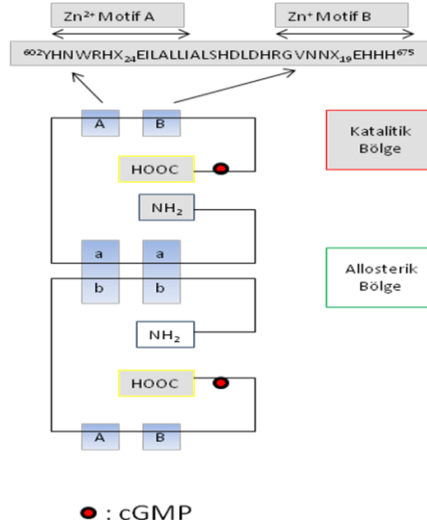
2.8.1. ENZİMİN YAPISI

Fosfodiesteraz-5, siklik guanozin monoosfat (cGMP) (Şekil 2.2) bağımlı ve spesifik hidrolitik bir enzimdir ve ilk olarak rat akciğerinden izole edilerek saflaştırılmıştır (68). Enzimin hem allosterik (regulatuvar) hem de katalitik kısımları cGMP'ye oldukça spesifiktir. İnsanda fosfodiesteraz-5 A geni 4q26 kromozomunda haritalanmış ve 21 hekzonu ile yaklaşık 100 kilobazdır (69). Enzimin modeli katalitik ve allosterik bölgeler içermektedir. Katalitik bölge, enzimin karboksil terminalinde bulunmakta ve iki adet çinko bağlanmış motif [A ve B] içermektedir. Allosterik bölge enzimin amino terminalinde bulunmaktadır. Enzimin katalitik bölgesi cGMP'ye daha yüksek oranda afinite gösterir, yani karboksil terminaline yakın yerleşimlidir. Enzim inhibitörleri katalitik bölgedeki cGMP ile ilişki halindedir.

Enzimdeki allosterik bölgede yerleşik iki bağımsız homolog cGMP-bağımlı bölge bulunmaktadır [a ve b]. Bu cGMP-bağımlı bölgenin Ser-92 aminoasidinin protein kinaz A veya G (PKA, PKG) ile spesifik fosforilasyonu ile enzim aktive olmaktadır. Bu aktivasyonla katalitik bölgedeki cGMP-bağımlı bölge etkileşimi başlamaktadır. Katalitik bölgedeki cGMP etkileşimi de allosterik bölgedeki cGMP bağlanmasını artırmakta; bu da fosforilasyonu uyarmaktadır (Şekil 2.3). Böylece daha çok cGMP yıkımı olmaktadır.



Şekil 2.2. cGMP'nin kimyasal yapısı.



Şekil 2.3. Fosfodiesteraz-5 enziminin çalışan modelinin çizimsel demonstrasyonu.

2.8.2. ETKİ MEKANİZMASI

Seksüel uyarı varlığında penil ereksiyonun olması için penil arterlerin ve korpus kavernozum düz kaslarının gevşemesi ve penil kan akımının artması gerekmektedir. Bu uyarı, sinir uçları ve endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit (NO) aracılı olmaktadır. NO, lokal olarak nonadrenerjik, nonkolinerjik postganglionik nörotransmitter gibi davranır ve guanilil siklazı aktive ederek hücre içi cGMP seviyesini artırmakta ve hücre içi kalsiyum seviyesini düşürerek düz kas gevşemesine yol açmaktadır (70). Böylece korpus kavernozum kan akımını artırmaktadır. Fosfodiesteraz-5 selektif inhibitörleri cGMPAMP dönüşümünü bloke ederek cGMP miktarını artırmaktadır (71,72).

2.9. AMAÇ

Bu çalışmada oksidatif strese karşı tadalafilin iskemi / reperfüzyon hasarını azaltmada etkili olabileceği hipotezinden yola çıkarak sıçan karın derisinden hazırlanan cilt ada flebinde uygulanan iskemi / reperfüzyon modelinde tadalafilin koruyucu ve/veya tedavi edici etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

3. MATERYAL & METOD

Bu çalışma, alınan etik kurulu kararı ile Sağlık Bakanlığı Ankara Eğitim ve Araştırma Hastanesi Deneysel Araştırma ve Hayvan Laboratuvarı Ünitesi'nde gerçekleştirilmiştir. Deney hayvanı olarak 60 adet, ağırlıkları 300-380 gram (ortalama 343gram) arasında değişen yetişkin sağlıklı Wistar sıçanları (*ratus norvegicus*) kullanılmıştır. Deney hayvanları pre-operatif ve post-operatif dönemlerde normal oda ısısında (24°C) ve ayrı kafeslerde tutularak takip edildiler.

Anestezi, intramüsküler yoldan verilen ketamin HCl (40 mg/kg, Ketalar 50 mg/cc, Parke-Davis) ve Xylazin HCl (10 mg/kg, Rompun, 23-32 mg/cc, Bayer) kombinasyonu ile sağlandı. Deney protokolü süresince uygulanacak girişimler için aynı dozlar ile anestezi idamesi sağlandı. Cerrahi girişimden önce deney hayvanlarının kullanılacak epigastrik bölgelerinde geniş bir şekilde epilatuvar krem kullanılarak kıllar alındı. Operasyon sahası önce cerrahi sabun (Hibisel, Doğu ilaç firması) sonra povidone-iodine (Batticon, Adeka İlaç Sanayi) ile temizlendi.

3.1. TADALAFİL

Bu çalışmada 20 miligramlık tablet formundaki tadalafil (Cialis®) kullanıldı. 20 miligramlık tadalafil tableti 20 cc serum fizyolojik ile karıştırıldı ve 1 cc birime 1 mg olacak şekilde ayarlanarak hazırlandı.

Hazırlanan tadalafil, grup III'teki ratlara 5 mg/kg dozda (ortalama doz 1,7 miligram) olacak şekilde ratın ağırlığına uygun olarak hesaplanıp nazogastrik sonda takılarak enteral olarak verildi.

3.2. DENEYSEL PROTOKOL

Bu deneysel çalışmada birincisi non - iskemik, ikincisi iskemik, üçüncüsü çalışma olmak üzere ve her bir grupta 20 adet denek olacak şekilde 3 ayrı grup oluşturuldu. Her gruptaki 20 adet hayvan 10'ar adetli alt gruplara ayrıldı. Hayvanların gruplara dağılımı rasgele yapıldı.

Grup I (non - iskemik grup, n=20): Gruptaki hayvanların hepsinden sıçan karın / kasık bölgesinde 7 x 4 cm.lik süperfisyal epigastrik arter ve ven pediküllü cilt ada flepleri eleve edildi. Bu gruptaki flepler herhangi bir işleme tabi tutulmadan yerlerine iade edildiler.

Grup I'deki hayvanların yarısı (n=10) reperfüzyonu takiben 12. saatte sakrifiye edildi (Grup Ia). Grup I'deki hayvanların diğer yarısı (n=10) reperfüzyonu takiben 7. günde sakrifiye edildi (Grup Ib).

Grup II (iskemi grubu, n=20): Grup I'deki hayvanlarda olduğu gibi sıçan karın / kasık bölgesinde 7 x 4 cm.lik süperfisyal epigastrik arter ve ven pediküllü cilt ada flepleri eleve edildi. Pediküller mikrovasküler damar klempleri kullanılarak 12 saat sıcak iskemiye maruz bırakıldı ve süre bitiminde reperfüzyon sağlandı.

Grup II'deki hayvanların yarısı (n=10) reperfüzyonu takiben 12. saatte sakrifiye edildi (Grup IIa). Grup II'deki hayvanların diğer yarısı (n=10) reperfüzyonu takiben 7. günde sakrifiye edildi (Grup IIb).

Grup III (çalışma grubu, n=20): Grup I ve II'deki hayvanlarda olduğu gibi sıçan karın/ kasık bölgesinde 7 x 4 cm.lik süperfisyal epigastrik arter ve ven pediküllü cilt ada flepleri eleve edildi. Pediküller mikrovasküler damar klempleri kullanılarak 12 saat sıcak iskemiye maruz bırakıldı ve süre bitiminde reperfüzyon sağlandı. Bu gruptaki sıçanların tümüne reperfüzyon sağlandıktan 30 dakika sonra 5 mg/ kg dozunda tadalafil enteral (nazogastrik sonda ile) olarak verildi.

Grup III'deki hayvanların yarısı (n=10) reperfüzyonu takiben 12. saatte sakrifiye edildi (Grup IIIa). Grup III'deki hayvanların diğer yarısı (n=10) grup IIIb olarak gruplandırıldı. Grup IIIb deki hayvanlara günlük 5 mg/kg dozunda tadalafil

enteral olarak verildikten sonra hayvanlar reperfüzyonu takiben 7. günde sakrifiye edildi.

3.2.1. CERRAHİ YÖNTEM

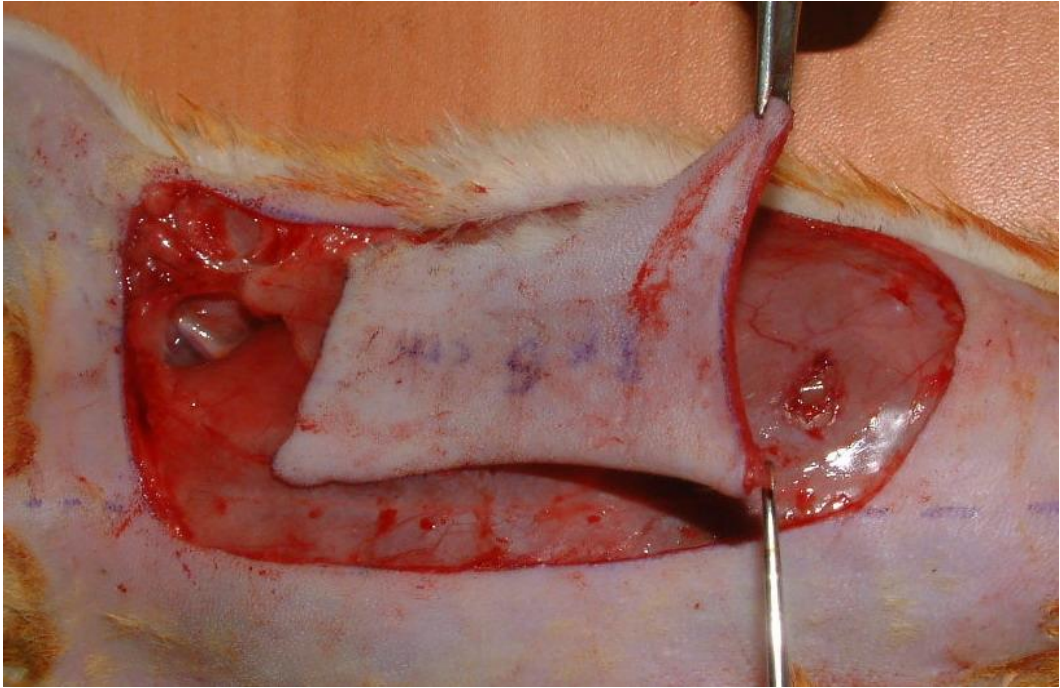
Cilt fleplerinde iskemi / reperfüzyon modeli için daha önce Petry ve arkadaşları tarafından tanımlanan deneysel model esas alındı (90). Her deney hayvanının sağ veya sol karın/ kasık bölgesinde 7 x 4 cm. deri flebi planlandı (Şekil 3.1). Flep elevasyonunda medial sınır olarak orta hat esas alındı. Tüm fleplerin kan akımı inferior süperfisyal epigastrik arter ve ven tarafından sağlandı (Şekil 3.2). Cerrahi'loop'kullanılarak yapılan diseksiyon ile cilt fleplerinin sadece bu arter ve ven tarafından beslenmesi sağlandı. Tüm m.ösküler dallar kesildi; cilt flepleri tam olarak bir'ada'flebi haline getirildi (Şekil 3.3). Daha sonra tüm flep pediküllerine 2 mm mikrovasküler klemp yerleştirildi (hem arter hem de eşlik eden veni içerecek şekilde). Bu şekilde tüm fleplerde total bir iskemi periyodu başlatıldı. Fleplerin medial, lateral, süperior ve inferior kenarları 5/0 polipropilen ile dikildi (Şekil 3.4).



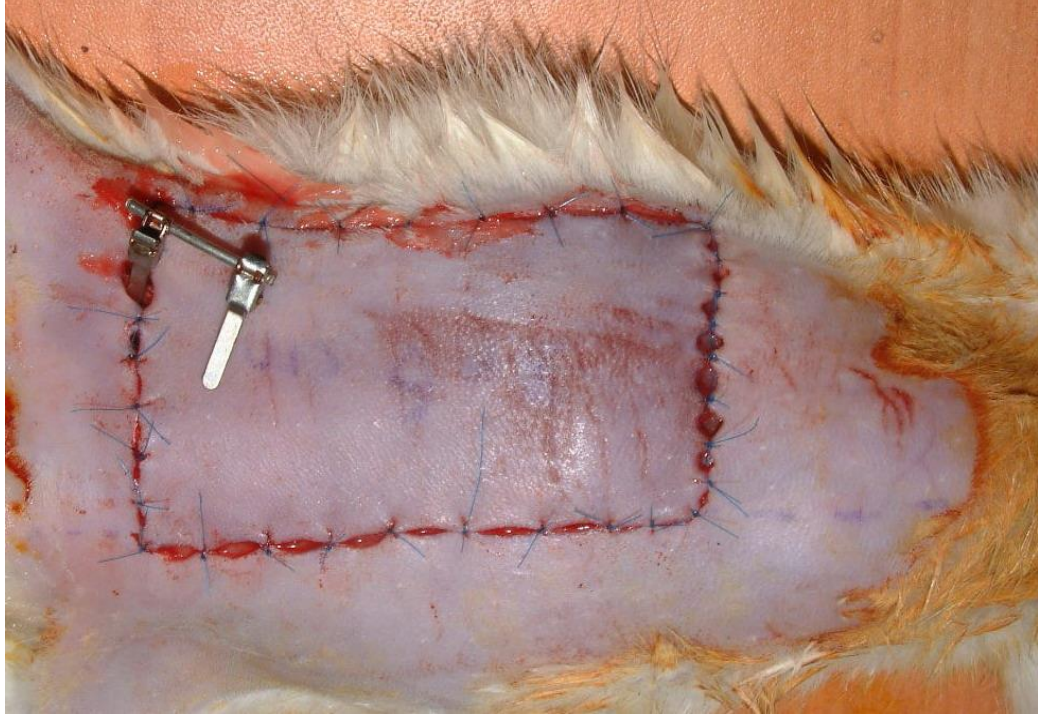
Şekil 3.1. Epigastrik bölgede flebin planlanması



Şekil 3.2. Yüzeyel epigastrik arter ve ven içeren flep pedikülü

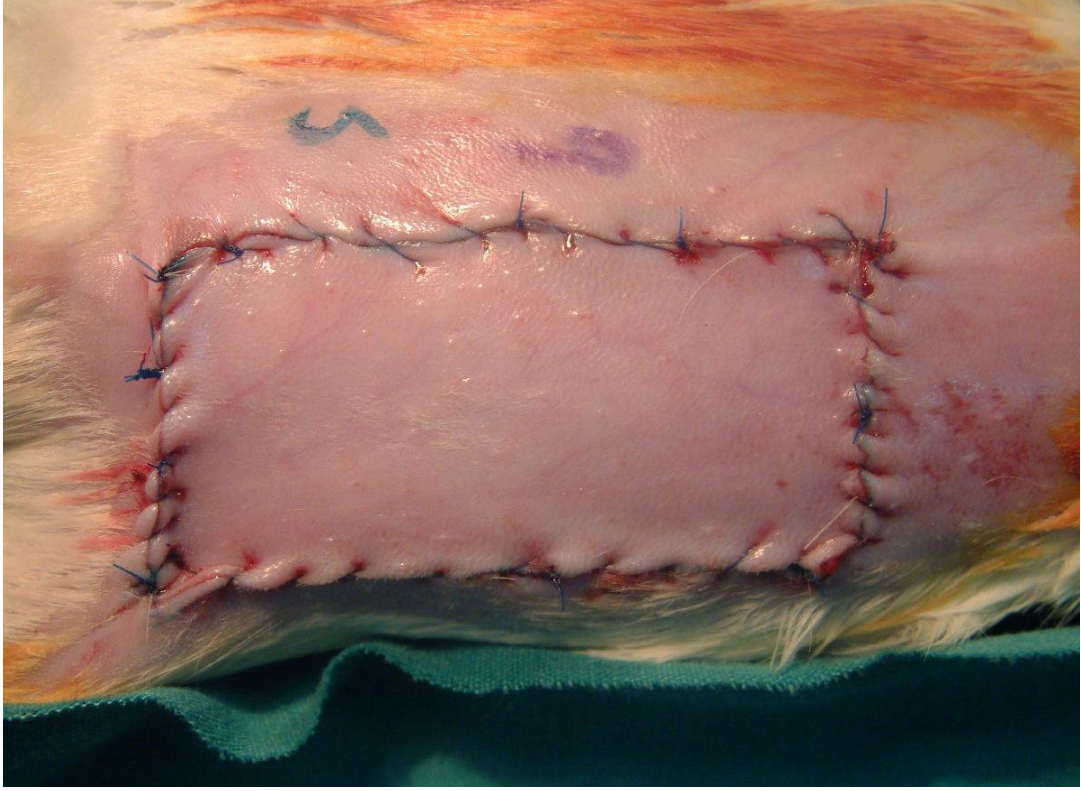


Şekil 3.3. Deri flebinin'ada flebi'şeklinde elevasyonu



Şekil 3.4. Pedikülü klemlenerek iskemi oluşturulmuş flep

12 saatlik iskemi periyodu sonrasında klemler alınarak vasküler pedikül açıldı ve iskemi periyodu sona erdirildi (91). Cerrahi mikroskop kullanılarak hem arter hem de vende akımın tekrar başladığı yani pedikülün açık ('patency') olup olmadığı kontrol edildi. Damarlar serum fizyolojik solüsyonu ile irrigé edilerek temizlendi ancak bu işlem esnasında vazospazma yol açmamak için vazoaaktif herhangi bir solüsyon kullanılmadı. Pedikülü serbestlemek ve gözlemlemek için flep inferiorundaki boşluk herhangi bir doku hasarına yol açmadan özenli bir biçimde tekrar suture edildi. Grup Ia, IIa, IIIa'daki flepler 24 saat; Grup Ib, IIb, IIIb'deki fleplerde 7 günlük bir izleme periyoduna alındı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5. Klempler açıldıktan sonra adapte edilmiş flep

Grup Ia, IIa, IIIa'daki hayvanlar reperfüzyonu takiben 12. saatte yüksek doz intraperitoneal pentotal (50mg/kg) verilerek sakrifiye edildi. Grup Ib, IIb, IIIb'deki hayvanlar 7 günlük izlem periyodlarını takiben, yüksek doz intraperitoneal pentotal verilerek sakrifiye edildi. Sakrifiye edilen hayvanların tümünün fleplerinden 4 x 1 cm.lik doku örnekleri alınıp malondialdehid (MDA), nitrit ve miyeloperoksidaz (MPO) ölçümleri için sıvı nitrojen ile donduruldu (92).

7. günde makroskopik olarak nekrotik ve canlı dokuların ayırımı oldukça iyi yapılabilmekteydi. Grup Ib, IIb, IIIb'deki hayvanlara ait fleplerin 7.günde eşit mesafe ve eşit ışık altında dijital fotoğrafları çekildi. Elde edilen görüntüler bilgisayar ortamına aktarıldıktan sonra, total flep alanı / nekrotik bölge alanı ve canlı bölge alanları dijital ortamda işaretlendi. Autocad 2004 Software (Autodesk, USA, Türkiye distribütörü: Sayısal Grafik) programı kullanılarak bu alanların birbirine oranları hesaplandı. Orijinal olarak 7 x 4 cm planlanan ve eleve edilen tüm fleplerin sınırlarında retraksiyonlar ve düzensizlikler gözlemlendi. Herhangi bir ek müdahale

yapılmadan sadece nekrotik ve canlı alanların yüzde oranları her üç grup arasında kıyaslandı.

3.2.2. BİYOKİMYASAL ANALİZ

Tüm gruplardan alınan doku örnekleri iki eşit parçaya bölünerek çalışma gününe kadar -86 °C'de saklandı. İkiye bölünmüş dokunun bir parçası, analitik terazide (Shimadzu, AX-200) ayrı ayrı tartılarak ağırlıkları kaydedildi.

Doku örnekleri, 1/10 oranında olacak şekilde % 1.15 KCl (Potasyum klorid, Merck) ilave edilerek homojenize edildi.

3.2.2.1. TOTAL NİTRİT TAYİNİ

Doku örnekleri, 1/10 oranında olacak şekilde % 1.15 KCl ilave edilerek homojenize edildi.

Nitrit ve düzeylerinin ölçümü için Smarason tarafından modifiye edilen kolorimetrik yöntem kullanıldı. Bu metotta nitratın nitrat redüktaz enzimi ile nitrite çevrilmesi baz alınır. Oluşan reaksiyon ürünü pembe renk verir ve absorbans ölçümleri 548 nm.de spektrofotometrik (Klinik Spektrofotometre) olarak yapıldı. (Griess reaksiyonu)(93)

Kullanılan cihaz: Klinik spektrofotometre, Shimadzu CL-770

3.2.2.2. MALONDİALDEHİD (MDA) TAYİNİ

Doku örnekleri, 1/10 oranında olacak şekilde % 1.15 KCl ilave edilerek homojenize edildi.

MDA düzeylerinin ölçümü için Wasowicz ve arkadaşları tarafından tarif edilen fluorometrik yöntem kullanıldı. Bu metotta tiyobarbiturik asit (TBA) ile MDA'nın reaksiyonu sonucu oluşan ürünün spektrofluorometrede (HITACHI F-

2500) uyarılmış dalga boyu 525 nm, emisyon dalga boyu 547 nm.de okunması ile MDA düzeyleri belirlendi (94).

Kullanılan cihaz: Spektrofluorometre, HITACHI F-2500

3.2.2.3. MİYELOPEROKSİDAZ TAYİNİ (MPO)

Doku örnekleri, 1/10 oranında olacak şekilde % 1.15 KCl ilave edilerek homojenize edildi. 50 mmol/l fosfat tamponda (pH 6), % 0.5 hegzodesiltrimetilamonyum bromür hazırlandı ve doku örneklerine, 1/15 oranında olacak şekilde hazırlanan bu tampon, ilave edilerek buzlu bir kabın içerisinde homojenize edildi. Daha sonra bu homojenat -20 °C de donduruldu, bunu takiben donmuş homojenat oda ısısında tekrar çözündü ve tekrar homojenize edildi. Bu işlem (homojenizasyon-dondurma-çözdürme) 3 kez tekrar edildi. Soğutmalı santrifüjde 40000 x g.de 15 dakika santrifüj edildi. Süpernatandan 0.1 ml alınarak MPO aktivitesi tayini gerçekleştirildi. Daha sonra bu homojenattan MPO tayini gerçekleştirildi (95).

Kullanılan cihaz: Klinik Spektrofotometre, Shimadzu CL-770

3.2.3. HISTOPATOLOJİK ANALİZ

Alan hesaplamaları yapıldıktan sonra tüm spesimenler histopatolojik inceleme için 24 saat süreyle 4⁰C de %10'luk tamponlanmış formalin fiksasyon solüsyonu içine alındı. Daha sonra histopatolojik tetkik amacıyla hematoksilen – eozin (HE) boyama tekniği kullanıldı. Nötrofil infiltrasyonu, ödem, nekroz, neovaskülarizasyon ve fibrozis oranları aynı patolog tarafından değerlendirildi.

3.2.4. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

İstatistiksel analiz için kişisel bilgisayar ve 'SPSS 11.0 for Windows Release (Microsoft Corporation, USA)' yazılım programı kullanıldı. Bağımsız gruptan elde edilen sonuçların istatistiksel olarak farklı olup olmadığı ilişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi kullanılarak gerçekleştirildi. $P < 0.05$ değeri istatistiksel anlamlı olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

Çalışmanın sonuna kadar hiçbir hayvanda ölüm gözlenmedi. Gözlem süresi boyunca hiçbir hayvanda enfeksiyon, seroma, hematoma gibi lokal flep sorunları oluşmadı. Grup Ia, IIa, IIIa'daki sıçanlar reperfüzyonun 12. saatinde, grup Ib, IIb, IIIb'deki sıçanlar post-operatif 7. günde aşırı dozda sodyum fenobarbital verilerek kurban edildi. Biyokimyasal analizler için spesimenler alındıktan sonra flepler histopatolojik incelemeler için alındı. Grup Ib, IIb, IIIb'deki hayvanların flep nekroz alanlarının hesaplanabilmesi için fotoğraflandı.

4.1. BİYOKİMYASAL ANALİZ

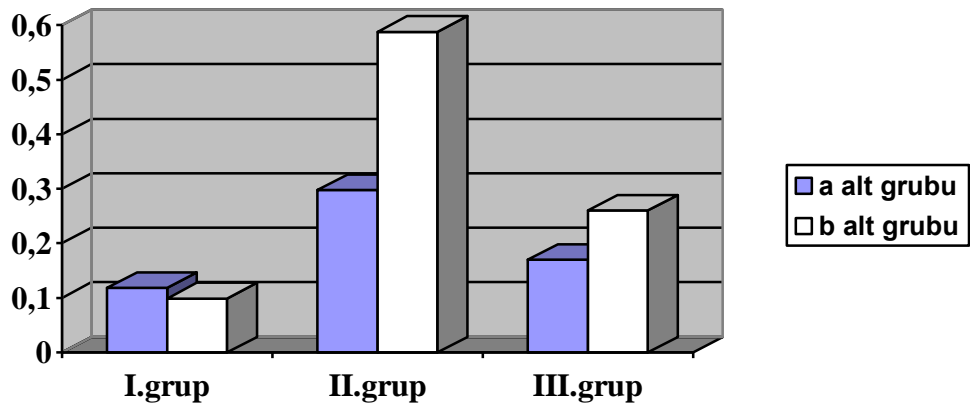
Grup Ia, IIa, IIIa'daki sıçanlar reperfüzyonu takip eden 12. saatte, Grup Ib, IIb, IIIb'deki sıçanlar reperfüzyonu takip eden 7. günde kurban edilmeden önce fleplerden 4 x 1 cm.lik doku örnekleri alınarak doku total nitrit, malondialdehid (MDA), miyeloperoksidaz (MPO) düzeyleri ölçüldü. Tablo 4.1 ve Tablo 4.2 tüm deneklerden elde edilen biyokimyasal değerleri, Tablo 4.3, Tablo 4.4 ve Tablo 4.5'da biyokimyasal tetkik ortalamalarını göstermektedir.

Tablo 4.1. Grup Ia, IIa, IIIa için total nitrit, MDA, MPO değerleri

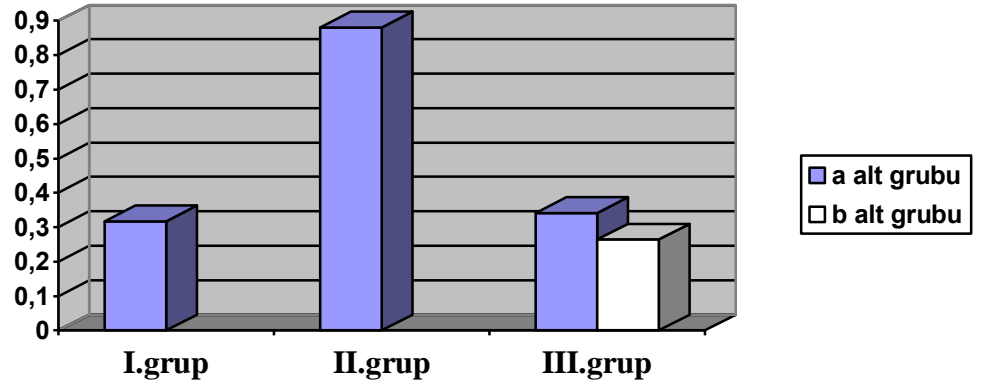
GRUP	DENEK NO/ BİYOKİMYASAL SONUÇ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
	Total Nitrit	0,13	0,05	0,06	0,04	0,36	0,09	0,08	0,07	0,09	0,21
	(nmol/mg)										
Ia	MDA	0,29	0,25	0,28	0,2	0,76	0,31	0,22	0,34	0,29	0,23
	(nmol/ mg)										
	MPO	17,63	6,94	14,01	36,66	36,22	20,34	23,47	19,34	22,14	19,43
	(mU/ mg)										
	Total Nitrit	0,18	0,49	0,12	0,35	0,28	0,12	0,47	0,32	0,29	0,36
	(nmol/mg)										
IIa	MDA	0,63	1,38	1,03	1,22	0,49	0,88	0,91	0,78	0,67	0,82
	(nmol/ mg)										
	MPO	67,86	92,03	26,09	61,54	99,67	135,82	78,45	83,79	92,58	68,32
	(mU/ mg)										
	Total Nitrit	0,29	0,19	0,23	0,16	0,12	0,19	0,08	0,11	0,16	0,17
	(nmol/mg)										
IIIa	MDA	0,33	0,21	0,50	0,31	0,25	0,40	0,37	0,29	0,41	0,34
	(nmol/ mg)										
	MPO	21,91	32,34	40,05	41,01	47,24	37,64	37,11	29,56	32,78	40,89
	(mU/ mg)										

Tablo 4.2. Grup Ib, IIb, IIIb için total nitrit, MDA, MPO değerleri

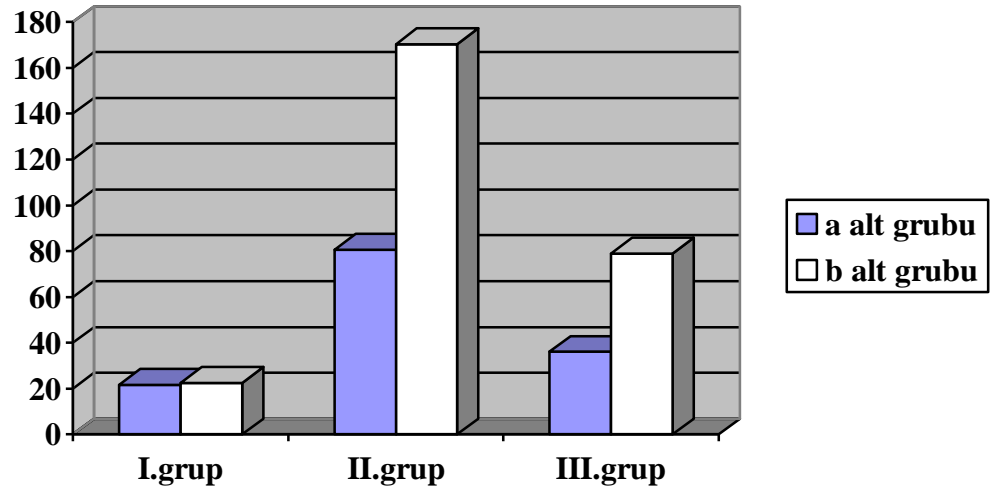
GRUP	DENEK NO/ BİYOKİMYASAL SONUÇ	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Ib	Total Nitrit	0,07	0,06	0,07	0,04	0,17	0,13	0,12	0,11	0,14	0,08
	(nmol/mg)										
	MDA	0,29	0,16	0,16	0,14	0,34	0,21	0,25	0,41	0,15	0,22
	(nmol/ mg)										
IIb	MPO	14,78	2,70	17,43	11,86	41,74	43,69	19,32	22,47	21,55	30,14
	(mU/ mg)										
	Total Nitrit	0,48	0,39	0,45	0,37	0,40	0,57	0,41	0,90	1,06	0,85
	(nmol/mg)										
IIIb	MDA	0,64	0,46	1,03	0,71	0,24	0,56	0,83	0,85	0,60	0,72
	(nmol/ mg)										
	MPO	40,71	135,39	124,06	167,66	244,55	271,96	182,71	169,82	122,19	243,96
	(mU/ mg)										
IIIb	Total Nitrit	0,18	0,30	0,14	0,17	0,65	0,11	0,37	0,27	0,19	0,22
	(nmol/mg)										
	MDA	0,20	0,23	0,22	0,45	0,27	0,18	0,23	0,44	0,27	0,15
	(nmol/ mg)										
IIIb	MPO	54,11	110,34	63,22	92,78	96,73	88,44	121,98	61,49	41,40	59,48
	(mU/ mg)										

Tablo 4.3. Total nitrit ortalama değerleri (nmol/mg)

Tablo 4.4. MDA ortalama değerleri (nmol/mg)



Tablo 4.5. MPO ortalama değerleri (mU/mg)



4.2. İSTATİSTİKSEL ANALİZ

4.2.1. TOTAL NİTRİT

4.2.1.1. GRUP IA – IIA KARŞILAŞTIRMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİK GRUBUN 24. SAAT SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaştırmada p değeri 0,017 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.6).

Tablo 4.6. Grup Ia – Iia total nitrit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	5,67	51,00	2.395	0,017
Pozitif Sıra	1	4,00	4,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

**4.2.1.2. GRUP IIA – IIIA KARŞILAŞTIRMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ
GRUBUNUN 24. SAAT SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)**

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,028 ($p < 0,05$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.7).

Tablo 4.7. Grup Iia – IIIa total nitrit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	7	7,00	49,00	2,194	0,028
Pozitif Sıra	3	2,00	6,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

**4.2.1.3. GRUP IB – IIB KARŞILAŞTIRMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİK
GRUBUN 7. GÜN SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)**

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,005 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.8).

Tablo 4.8. Grup Ib – IIb total nitrit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	10	5,50	55,00	2,805	0,005
Pozitif Sıra	0	0	0		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.1.4. GRUP IIb – IIIb KARŞILAŞTIRMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ GRUBUNUN 7.GÜN SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada *p*'değeri 0,007 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.9).

Tablo 4.9. Grup IIb – IIIb total nitrit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	5,67	51,00	2,397	0,007
Pozitif Sıra	1	4,00	4,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.2. MALONDIALDEHİD (MDA)

4.2.2.1. GRUP IA – IIA KARŞILAŞTIRMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİK GRUBUN 24. SAAT SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,445 ($p > 0,05$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha az yükselmiştir (Tablo 4.10).

Tablo 4.10. Grup Ia – Iia malondialdehit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	7	5,00	35,00	0,764	0,445
Pozitif Sıra	3	6,67	20,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.2.2. GRUP IIA – IIIA KARŞILAŞTIRMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ GRUBUNUN 24. SAAT SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,005 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.11).

Tablo 4.11. Grup Ila – IIIa malondialdehit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	10	5,50	55,00	2.805	0,005
Pozitif Sıra	0	0	0		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.2.3. GRUP IB – IIB KARŞILAŞTIRMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİK GRUBUN 7. GÜN SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada *p* değeri 0,007 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.12).

Tablo 4.12. Grup Ib – Iib malondialdehit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	6,00	54,00	2,703	0,007
Pozitif Sıra	1	1,00	1,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

**4.2.2.4. GRUP IIb – IIIb KARŞILAŞTIRMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ
GRUBUNUN 7.GÜN SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)**

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,007 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.13).

Tablo 4.13. Grup Iib – IIIb malondialdehit sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	6,00	54,00	2,701	0,007
Pozitif Sıra	1	1,00	1,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.3. MİVELOPEROKSİDAZ (MPO)

**4.2.3.1. GRUP IA – IIA KARŞILAŞTIRMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİK
GRUBUN 24. SAAT SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)**

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,005 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.14).

Tablo 4.14. Grup Ia – Iia miyeloperoksidaz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	10	5,50	55,00	2,803	0,005
Pozitif Sıra	0	0	0		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.3.2. GRUP IIA – IIIA KARŞILAŞTIRMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ GRUBUNUN 24. SAAT SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,007 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.15).

Tablo 4.15. Grup Iia – IIIa miyeloperoksidaz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	6,00	54,00	2,701	0,007
Pozitif Sıra	1	1,00	1,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.3.3. GRUP IB – IIB KARŞILAŞTIRMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİK GRUBUN 7. GÜN SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,005 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.16).

Tablo 4.16. Grup Ib – Iib miyeloperoksidaz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	10	5,50	55,00	2,803	0,005
Pozitif Sıra	0	0	0		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.3.4. GRUP IIB – IIIB KARŞILAŞTIRMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ GRUBUNUN 7.GÜN SONUÇLARININ KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada p 'değeri 0,007 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.17).

Tablo 4.17. Grup IIb – IIIb miyeloperoksidaz sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	6,00	54,00	2,701	0,007
Pozitif Sıra	1	1,00	1,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.2.4. SONUÇ

Yapılan biyokimyasal tetkik sonuçlarının istatistiksel olarak karşılaştırmasında, total nitrit, MDA ve MPO değerlerinin iskemi / reperfüzyon hasarında önemli ölçüde arttığı ancak tadalafil ile tedavi edilen grupta bu artışın anlamlı olarak daha az olduğu gösterilmiştir.

4.3. FLEP YAŞAYABİLİRLİKLERİ

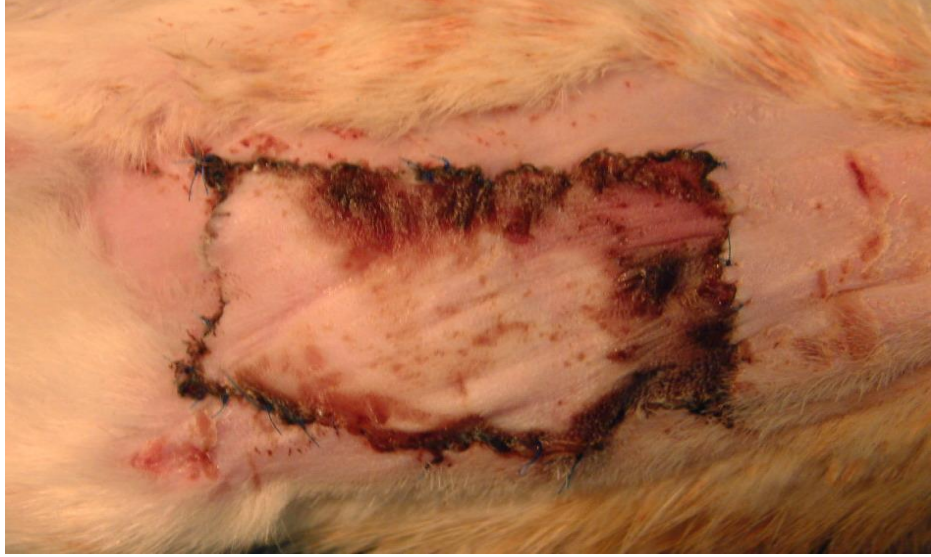
Tüm gruptaki sıçanların flep yaşayabilirlik ölçüm sonuçları ve ortalama değerleri Tablo 4.18’de verilmiştir.

Grup Ib (n=10): Non - iskemik grupta post-operatif 7. günde ortalama flep nekroz alanı % 13,2 (0-27) olarak bulundu (Şekil 4.1).



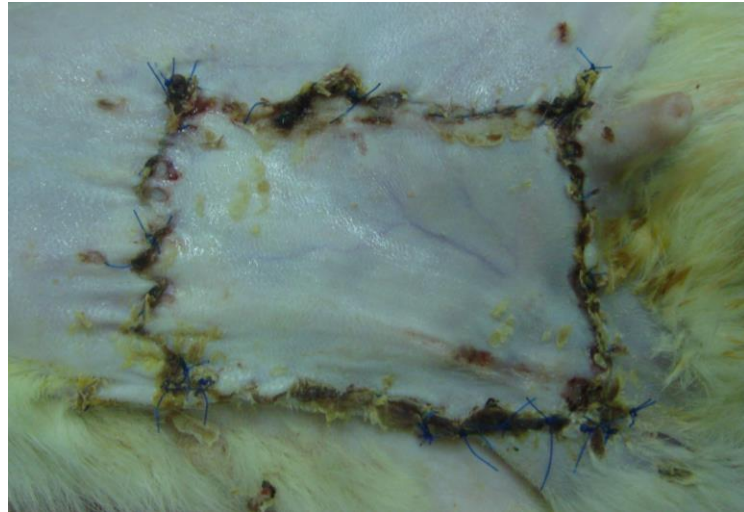
Şekil 4.1. Non – iskemik gruba ait bir flepte (hayvan no: 4) 7. gün sonunda flebin görünümü

Grup IIb (n=10): İskemi grubunda 12 saatlik iskemi sonucunda post-operatif 7. günde ortalama flep nekroz alanı % 43,2 (27 – 61) olarak bulundu (Şekil 4.2).



Şekil 4.2. İskemi grubuna ait bir flepte (Hayvan No: 5) 7. gün sonunda flebin görünümü

Grup IIIb (n=10): Tedavi grubunda 12 saatlik iskemi sonucunda post-operatif 7. günde ortalama flep nekroz alanı % 20,3 (8 – 31) olarak bulundu (Şekil 4.3).



Şekil 4.3. Tadalafil tedavi grubuna ait bir flepte (Hayvan No:1) 7. gün sonunda flebin görünümü

Tablo 4.18. Sonuçlar: Fleplerin nekrotik alanları (% olarak tam sayı değerleri alınmıştır).

SIÇAN NO	Grup Ib (Non-iskemik grup)	Grup IIb (İskemi grubu)	Grup IIIb (Tedavi grubu)
1	9	29	9
2	27	57	15
3	11	42	22
4	0	32	13
5	12	46	20
6	17	74	16
7	13	28	25
8	19	36	19
9	10	61	26
10	14	27	34
Ortalama	13,2 (%)	43,2 (%)	19,9 (%)

4.4. FLEP NEKROZ ALAN ÖLÇÜMLERİNİN İSTATİSTİKSEL OLARAK KARŞILAŞTIRILMASI

4.4.1. GRUP IB – II B KARŞILAŞTIRILMASI (NON – İSKEMİK GRUP İLE İSKEMİ GRUBUNUN KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada *p*'değeri 0,005 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.19).

Tablo 4.19. Grup Ib – Iİb flep viabilite ölçümlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	0	0	0	2,803	0,005
Pozitif Sıra	10	5,50	55,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.4.2. GRUP IİB – III B KARŞILAŞTIRILMASI (İSKEMİK GRUP İLE TEDAVİ GRUBUNUN KARŞILAŞTIRILMASI)

İlişkili ölçümler için Wilcoxon işaretli sıralar testi ile yapılan karşılaşmada *p*'değeri 0,009 ($p < 0,02$) olarak bulunmuştur. Yani iskemik grupta 24. saat sonundaki total nitrit düzeyi non – iskemik gruba göre daha fazla yükselmiştir (Tablo 4.20).

Tablo 4.20. Grup Iİb – IIIb flep viabilite ölçümlerinin istatistiksel olarak karşılaştırılması

	Sayı (n)	Sıra Ortalaması	Sıra Toplamı	z değeri*	p değeri
Negatif Sıra	9	5,89	53,00	2,601	0,009
Pozitif Sıra	1	2,00	2,00		
Eşit	0				

* Z değeri negatif sıralar temeline dayalı olarak verilmiştir.

4.4.3. SONUÇ

Fleplerdeki nekrotik alan ölçümlerine göre iskemi / reperfüzyon grubunda flep nekroz alanında önemli bir artış olmasına rağmen, tedavisi ile tedavi edilen grupta nekroz oranının daha az olduğu gösterilmiştir.

4.5. HISTOPATOLOJİK İNCELEME

Histopatolojik inceleme amacıyla hematoxilen - eozin (HE) boyama tekniği kullanıldı. Tüm gruplardan 5 mikrometre (μm) kalınlığında kesitler elde edildi. Grup Ia, IIa, IIIa arasındaki histopatolojik incelemelerde nötrofil infiltrasyonu, nekroz oranı ve ödem miktarı kıyaslandı. En yoğun nötrofil infiltrasyonu, nekroz oranı ve ödem miktarı Grup IIa da iken en az nötrofil infiltrasyonu, nekroz oranı ve ödem miktarı Grup Ia'da elde edildi (Şekil 4.4, 4.5, 4.6). Gruplar arasındaki histopatolojik özelliklerin skorlaması yapılmıştır (Tablo 4.21).

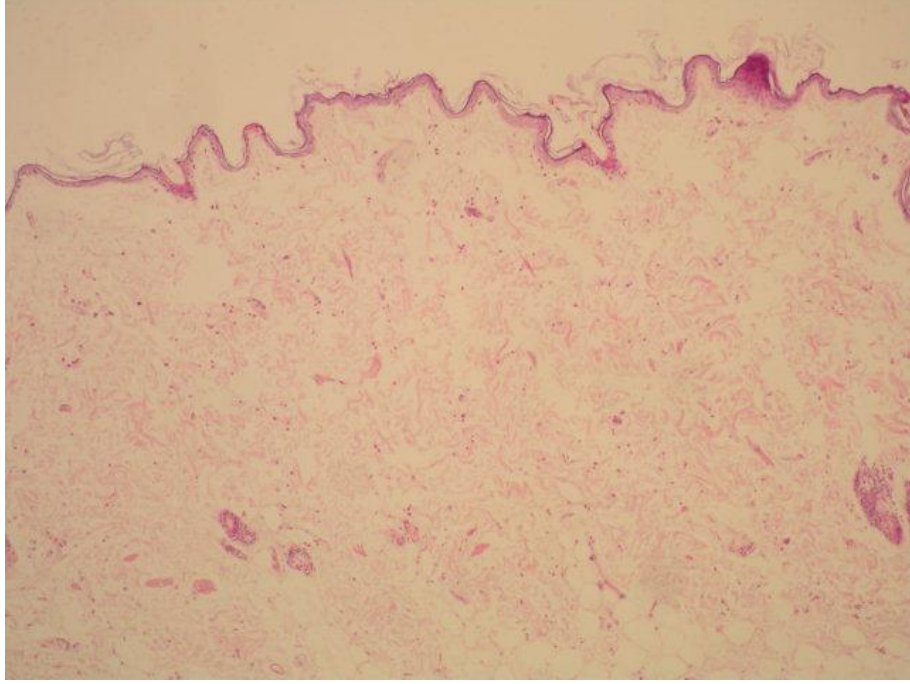
Tablo 4.21. Her üç grubun 24. saat örneklerinin histolojik skorların karşılaştırılması

Histolojik bulgular	Grup Ia (Non-iskemik grup)	Grup IIa (İskemik grup)	Grup IIIa (Tedavi grubu)
Ödem	++	++++	++
Nötrofil infiltrasyonu	+	++++	++
Nekroz oranı	+	+++	++
(+: Çok az ++: Az +++: Orta ++++: Çok)			

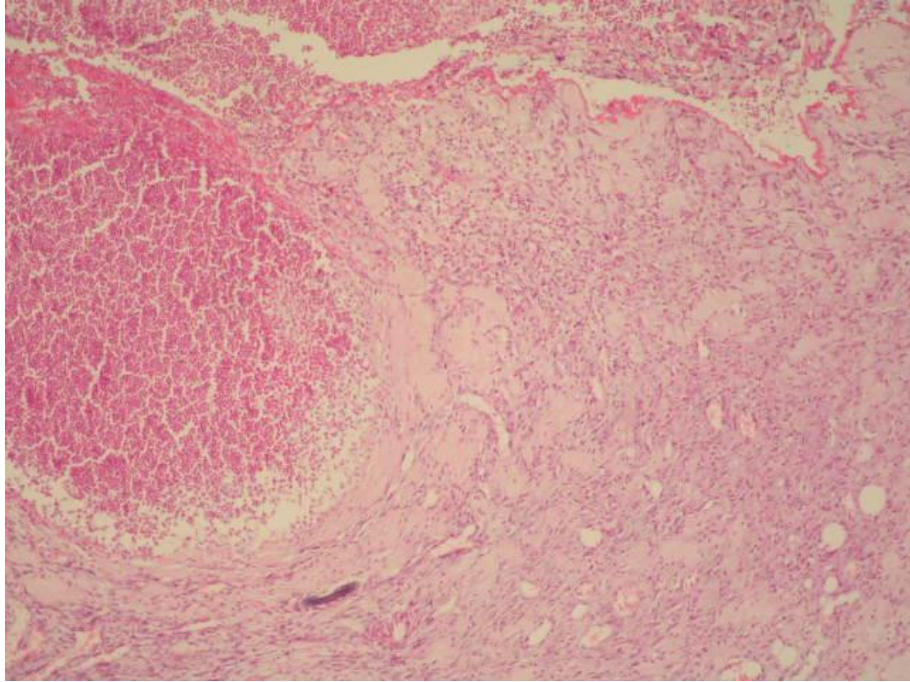
Grup Ib, IIb, IIIb arasındaki histopatolojik incelemelerde nötrofil infiltrasyonu, nekroz oranı, ödem miktarı, fibrozis ve neovaskularizasyon miktarları kıyaslandı. En yoğun nötrofil infiltrasyonu, nekroz, fibrozis, ödem miktarı ve en az neovaskularizasyon oluşumu grup IIb’de iken en az nötrofil infiltrasyonu, nekroz, fibrozis, ödem miktarı, en fazla neovaskularizasyon oluşumu grup Ib’de gözlemlendi (Şekil 4.7, 4.8, 4.9). Gruplar arasındaki histopatolojik özelliklerin skorlaması yapılmıştır (Tablo 4.22).

Tablo 4.22. Her üç grubun 7. gün örneklerinin histolojik skorların karşılaştırılması

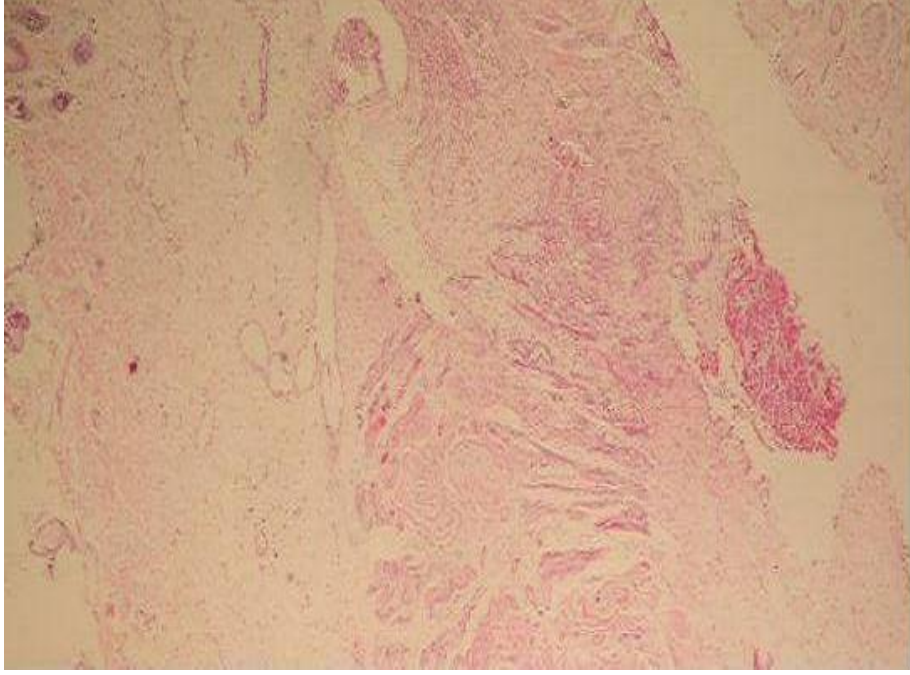
Histolojik bulgular	Grup Ib (Non-iskemik grup)	Grup IIb (İskemik grup)	Grup IIIb (Tedavi grubu)
Ödem	++	++++	++
Nötrofil infiltrasyonu	+	++++	++
Nekroz oranı	+	+++	++
Fibrozis	+	+++	++
Neovaskülarizasyon	++++	+	+++
(+: Çok az ++: Az +++: Orta ++++: Çok)			



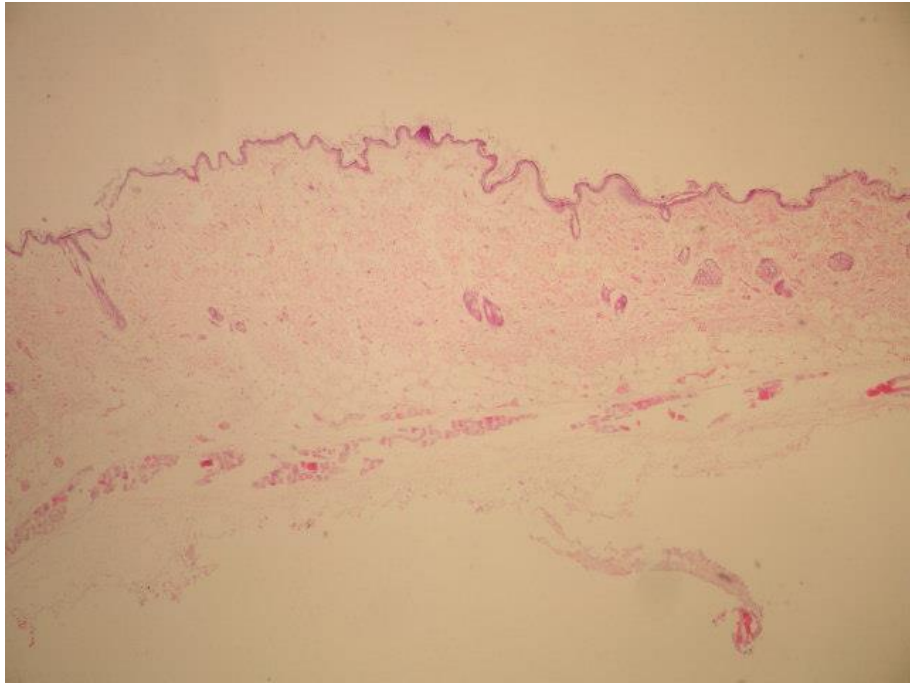
Şekil 4.4. *Grup Ia:* Nötrofil infiltrasyonu, ödem ve nekroz oranı az miktarda görülmekte (H & E, x10)



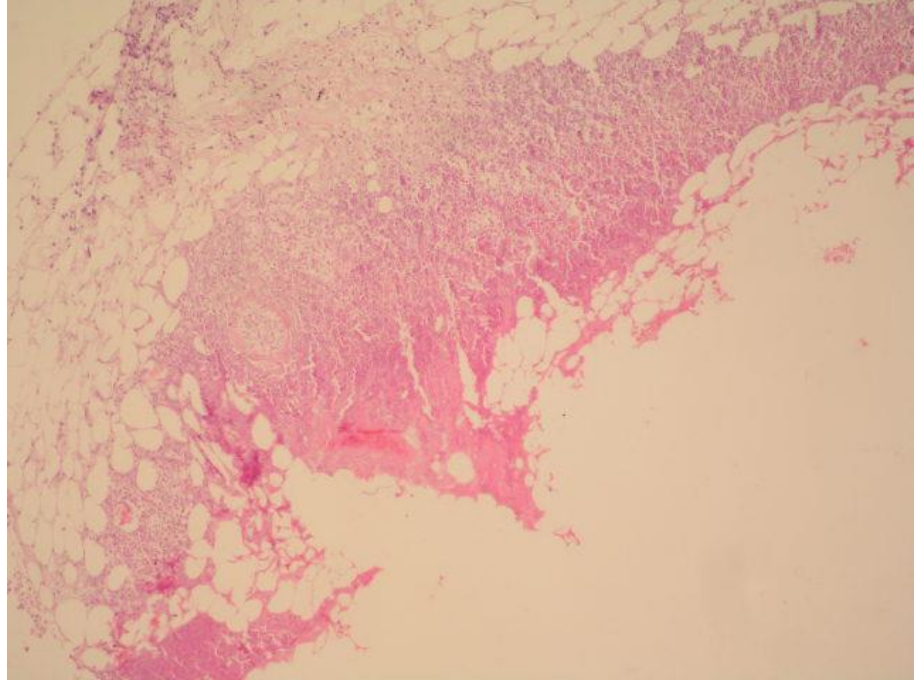
Şekil 4.5. *Grup IIa:* Nötrofil infiltrasyonu, ödem ve nekroz oranı oldukça fazla miktarda görülmekte (H & E, x20)



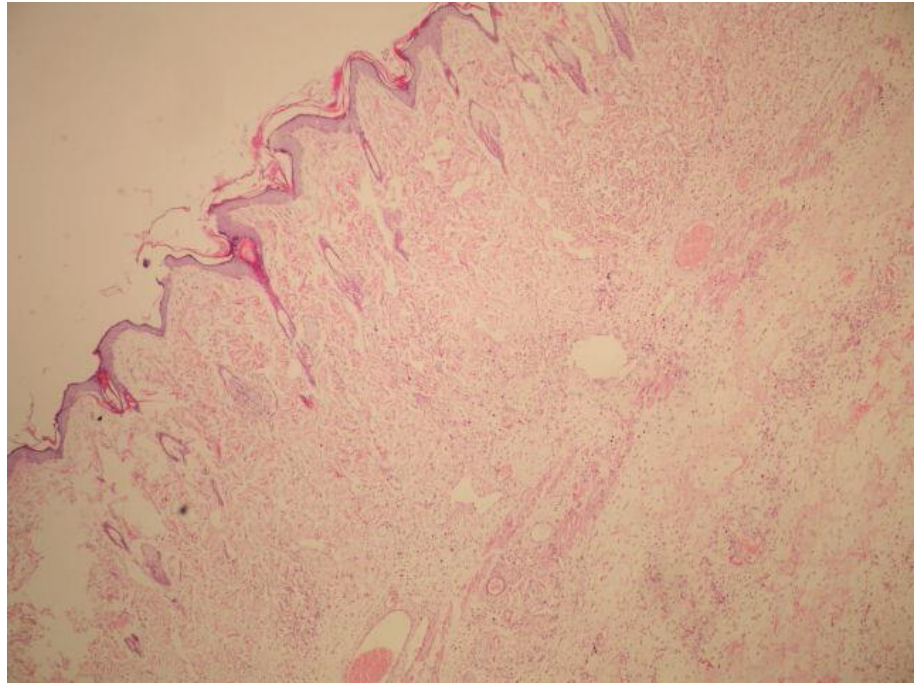
Şekil 4.6. *Grup IIIa:* Nötrofil infiltrasyonu, ödem ve nekroz oranı, grup IIa'dan belirgin olarak daha az miktarda görülmekte (H & E, x10)



Şekil 4.7. *Grup Ib:* Nötrofil infiltrasyonu, ödem, fibrozis ve nekroz oranı az miktarda; neovaskularizasyon çok miktarda görülmekte (H & E, x10)



Şekil 4.8. *Grup IIb:* Nötrofil infiltrasyonu, ödem, fibrozis ve nekroz oranı oldukça fazla miktarda; neovaskularizasyon ise çok az miktarda görülmekte (H & E, x15)



Şekil 4.9: *Grup IIIb:* Nötrofil infiltrasyonu, ödem, fibrozis ve nekroz oranı grup IIb'den az; neovaskularizasyon ise daha çok miktarda görülmekte (H & E, x20)

5. TARTIŞMA

Serbest doku transferleri veya replantasyon gibi mikrovasküler cerrahi girişimlerde, cerrahi esnasında zorunlu bir iskemi periyodu olmaktadır. Hangi sebeple olursa olsun iskemi, doku hipoksisine ve anaerobik metabolizmanın devreye girmesine sebep olmaktadır. ATP bazında hücrel enerjinin azalması, önemli miktarda intrasellüler kalsiyum, NADPH ve hipoksantin gibi sitoplazmik metabolitlerin akümüasyonu ile sonuçlanmaktadır (96). Artan intrasellüler kalsiyum, 'ikincil mesajcı' olarak inflamatuvar mediatörlerin üretimine neden olan birçok enzimi aktif hale geçirir. Aşırı metabolit birikimi, hücrede osmotik bir yüklenme oluşturur ki bu da hücre şişmesine ve hücre membranında hasara yol açar (17, 97).

İskemiye karşı doku toleransını arttırmak için birçok metod denenmektedir. Bu metodlar arasında en önemlileri; soğutma, fizyolojik yıkama solüsyonları, kalsiyum kanal blokörlerinin kullanımı, yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin kullanımı, serbest oksijen radikallerinin temizleyicisi antioksidan maddelerin kullanımı, iskemik 'preconditioning' ve farmakolojik ajanların kullanımındadır (17).

Replantasyonu planlanan ampute parçanın veya serbest aktarım için eleve edilmiş flebin soğutulması, iyi bilinen ve hücrel metabolizmayı yavaşlatarak kritik iskemi zamanını uzattığı için kullanılan bir metoddur (98 – 100). 1997'de Zhan ve ark. organ prezervasyonu için standart olarak kullanılan soğuk Euro-Collins solüsyonuna (4⁰ C)'trehalose' gibi hücre membran stabilizatörleri ekleyerek iskemiye maruz kalmış iskelet kaslarında iskemiye toleransı başarılı bir biçimde arttırmışlardır (101).

1987'de Rosen ve ark. daha sonra da 1992'de Gordon ve ark. iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla dokuların fizyolojik solüsyonlar ile yıkanmasını denemişler ve vasküler hiperpermeabilitenin geciktirilmesi mekanizması ile iskemiye karşı doku toleransını arttırmışlardır (102, 103).

Replantasyon dokularında iskemi - reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik yüksek enerjili fosfat bileşikleri ile serbest oksijen radikal temizleyicilerinin birlikte kullanımını Ablove RH ve ark. iskemik ekstremite modelinde denemişler ve başarılı sonuçlar elde etmişlerdir (104).

İskemi - reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik girişimlerden birisi de 'iskemik preconditioning'dir ve 1997'de Carroll ve ark tarafından kas nekrozlarını azaltmak amacıyla denenmiştir (105). İskemik 'Preconditioning', geniş iskemi reperfüzyon hasarı beklenen dokularda koruma ve hasarı azaltma amaçlı isteyerek yapılmış kısa iskemi periyodlarını içerir (106).

İskelet kaslarında iskemik 'Preconditioning'in mekanizması, hücre membranlarındaki potasyum kanallarının ve A_1 reseptörlerinin aktivasyonunu içerir ki bu da hücre içerisinde enerji kaybının azaltılması ve iskemi esnasında metabolit birikiminin azaltılmasını amaçlar (17, 97). Adenozin gibi A_1 reseptörlerinin stimülasyonunu veya kromalin gibi potasyum kanal aktivasyonunu sağlayan farmakolojik ajanlar iskemik preconditioning mekanizmasını taklit ederler ve iskemiye karşı iskelet kaslarının toleransını artırır (107, 108). Bu yeni konsept, 'akut farmakolojik preconditioning' olarak adlandırılmaktadır (17) ancak bu ilaçlar, iskemiden hemen önce verilmelidir.

İskemik dokunun kan dolaşımı tekrar sağlandığında enzimatik reaksiyonlar sonucu içerisinde süperoksit radikali (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil radikalini (OH^-) içeren birçok serbest oksijen radikalleri açığa çıkar (17). Bu serbest oksijen reaktifleri hem endotelial hücrelere direkt hasar verirler hem de inflamatuvar mediatörlerin üretimini indüklerler. Bu yüzden iskemi - reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmalar, serbest oksijen radikallerinin inhibisyonu üzerine yoğunlaşmaktadır. Bu amaçla ksantin oksidaz inhibitörleri, süperoksit dismutaz veya katalaz gibi oksiradikal temizleyicileri, deferoxamin gibi demir bağlayıcıları, U74006F gibi lipid peroksidasyon inhibitörleri denenmiştir (109). Weiss ve ark.larının 1989'da yaptığı bir çalışmada oksiradikal temizleyicilerinin ratlarda ki replante dokuların canlılığını arttırdığı gösterilmiştir (110). Ancak halen klinik

uygulamada tam olarak etkinliği gösterilmiş bir oksiradikal temizleyicisi bulunmuş değildir (17).

İskemi - reperfüzyon hasarında önemli bir basamak da histamin, platelet aktive edici faktör (PAF), lökotrien B4, tümör nekrotizan faktör (TNF), tromboksan A2 ve interlökin 1 gibi inflamatuvar mediatörlerin açığa çıkmasıdır (17). Histamin; vasküler permeabilitenin artışı ve lökositlerin indüklenmesinden sorumludur (111). PAF; platelet agregasyonu, lökosit aktivasyonu, vasküler permeabilite artışı ve vazokonstrüksiyon yapan bir mediatördür. Bu bilgi doğrultusunda yapılan bir çalışmada PAF reseptör antagonistinin intraarteryel tek doz verilmesi iskemik fleplerde kas ve cilt yaşayabilirliğini arttırdığı gözlenmiştir (112). Lökotrien B4'ün esas fonksiyonu; lökosit adezyonunu indüklemesidir. Bununla birlikte, kemotaksisi uyarması, lökosit degranülasyonunu tetiklemesi ve oksijen radikallerinin üretimine neden olması diğer problematik basamaklardır. Bu nedenle Lökotrien B4 inhibisyonu (SC-41930 gibi lökotrien B4 reseptör antagonisti ile) iskemik dokuları reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olmaktadır (21). Tromboksan A2; potent bir vazokonstriktör ve platelet agregatörü olduğu için reperfüzyon hasarını ilerletmektedir. Aspirin veya ibuprofen gibi siklooksijenaz enzim inhibitörlerinin kullanımı ile Tromboksan A2 inhibisyonu sağlanabilmektedir (113).

Reperfüzyon hasarının bir diğer majör basamağı da iskemik dokulardaki venüllerin endotellerine lökositlerin yerleşmesidir (17) Lökositler ile endotel hücreleri arasındaki ilişki, 3 tane tek zincirli glikoprotein aracılığı ile sağlanmaktadır: P-selektin, E-selektin ve L- selektin. Erken ve geç fazlarda lökosit – endotel ilişkisini sağlayan glikoproteinlerden P- ve E- selektinler endotel tarafından sentezlenirken, L- selektinler lökosit yapılarında mevcuttur. İskemi – reperfüzyon olayında lökosit – endotel ilişkisinin bloke edilmesi; bu selektinlerin bloke edilmesi ile sağlanabilmektedir. Winn ve ark. pre-reperfüzyon safhasında anti-P-selektin monoklonal antikorlarının verilmesinin iskemik dokularda yaşayabilirliği arttırdığını göstermişlerdir (114). Başka bir çalışmada da EL-246 monoklonal antikor injeksiyonu ile E- ve L- selektinlerin blokajı ve iskemik hasarın önüne geçilmesi amaçlanmıştır (115) .

Tüm bu basamaklar, iskemi sonrası reperfüzyonu takiben çok kısa süreler içerisinde oluşmaktadır. Bu aşamada en önemli olay; gelen lökositlerin özellikle postkapiller venüllerdeki endotelial hücrelere adezyonudur (17). Bu ilişki, lökosit yüzeyindeki Beta 2 (CD18) glikoproteini ve endotelial interselüler adezyon molekülü (ICAM -1) arasındaki bağlantı ile oluşmaktadır. Zamboni ve ark. CD18 integrinlerine ve Ma ve ark. ICAM -1'e karşı geliştirilmiş monoklonal antikorlar vererek iskemi reperfüzyon hasarını azaltıcı çalışmalar yapmışlardır (116, 117).

Artık iyi bilinmektedir ki, venüllere lökosit adezyonuna, arteriyel vazokonstriksiyon eşlik etmektedir (17). Zamboni ve ark. 1993'te lökosit bağımlı vazoaaktif cevabı engelleyeceğini düşünerek, iskemik dokulara hiperbarik oksijen uygulamış ve hem arteriyel vazokonstriksiyonu hem de lökositlerin bu yolla venüllere adezyonunun bloke edilebileceğini öne sürmüşlerdir (118). Endotel hücreleri hem nitrik oksit gibi vazodilatör hem de endotelin -1 gibi vazokonstriktör ajanların üretme yeteneğine sahiptir. Bir çalışmada reperfüzyonun indüklediği vazokonstriksiyonun, endotelden lokal nitrik oksit üretiminde bir eksiklik ve buna zıt olarak endotelin - 1 sentezinin artması yüzünden meydana geldiği öne sürülmüştür (119, 120). Nitrik oksit, nitrik oksit sentetaz enzimi aracılığıyla yarı esansiyel bir aminoasit olan L-Arginin'den sentezlenmektedir (121). Normal şartlar altında NO, vazodilatasyon yaparak vasküler tonusun devam ettirilmesinde oldukça önemli bir mediatördür. İskemik koşullarda ise NO, serbest oksijen radikalleriyle ilişki sonucu oldukça zararlı olan peroksinitrit'e dönüşmektedir. Bu mekanizma da L-NAME gibi nitrik oksit sentetaz inhibitörlerinin paradoksik koruyucu etkisini açıklamaktadır (122 - 124).

Fosfodiesterazlar, fosfodiester bağıny yıkan enzimlerdir. Bu tabirle, sıklıkla, siklik nükleotid fosfodiesterazlar kastedilmektedir. Ancak, fosfolipaz C ve D, ototaksin, sfingomyelin fosfodiesteraz, DNAaz, RNAaz ve restriksiyon endonükleaz da fosfodiesterazdır.

Siklik nükleotid fosfodiesterazlar ikinci haberci molekülleri olan siklik adenozin monofosfat (cAMP) ve siklik guanozin monofosfat (cGMP) fosfodiester

bağlarını ayırırlar. Hücre için sinyal iletiminin yeri, süresi ve büyüklüğünü regüle ederler.

Fosfodiesterazlar ilk olarak Uzunov ve Weiss tarafından 1972'de rat beyinde izole etmişlerdir (108). Sonrasında da, çeşitli ajanlarla selektif olarak inhibe edilebileceği gösterilmiştir (109, 110).

Selektif fosfodiesteraz inhibitörlerinin terapötik ajan olarak kullanılabilmesi fikri 1977'de Weiss ve Hait tarafından ortaya atılmıştır (111). Bu fikir, günümüzde geniş kullanım alanı bulmuştur.

Memelilerde, fosfodiesteraz süper ailesi 11 enzimden oluşmaktadır. Bu sınıflandırma, enzimin aminoasit dizilimine, substrat seçiciliğine, denetim ve farmakolojik özelliklerine ve doku dağılımına göre yapılmaktadır.

Fosfodiesteraz-3, bazen cGMP bağımlı fosfodiesteraz olarak da adlandırılmaktadır. Fosfodiesteraz ismlendirmesinde ilk sıra aileyi, ikinci sıra geni ve üçüncü sıra da varyansı göstermektedir (örn: PDE1C3).

Fosfodiesteraz inhibitörleri, fosfodiesteraz ailesindeki belirli veya belirsiz enzimleri bloke etmektedir. Bunu, fosfodiesteraz alt tipinin kullandığı ikinci haberciler olan cAMP veya cGMP ile yapmaktadırlar.

5.1. SINIFLANDIRMA

Non-selektif fosfodiesteraz inhibitörleri

- Kafein (minör uyarıcı)
- Teofilin (bronkodilatör)
- IBMX (3-izobütil-1-metilksantin)

Fosfodiesteraz-1 selektif inhibitörleri

- Vinpocetin

- Zaprinast
- SCH-51866

Fosfodiesteraz-2 selektif inhibitörleri

- EHNA

Fosfodiesteraz-3 selektif inhibitörleri

- Enoksiman
- Milrinon (sempatik uyaran etkili)
- Silosatamit
- Amrinon

Fosfodiesteraz-4 selektif inhibitörleri

- Mezembrin (alkaloid)
- Rolipram (araştırmalarda kullanılır)
- İbudilast (nöroprotektif, bronkodilatör)
- Zadarverin
- Denbufilin
- Ro-20-1724
- RP-73401
- CDP-840

Fosfodiesteraz-5 selektif inhibitörleri

- Sildenafil
- Verdanafil
- Tadalafil
- Udenafil
- Avanafil
- Zaprinast
- DMPPO

- Dipiridamol
- E-4021
- SCH-51866
- GF-248

Fosfodiesteraz-6 selektif inhibitörleri

- Sildenafil
- Zaprinast
- E-4021
- DMPP0
- GF-248

Fosfodiesteraz-7 selektif inhibitörleri

- Benzotieno- ve benzotiadiazin dioksitleri

Fosfodiesteraz-8 selektif inhibitörleri

- Dipiridamol

Fosfodiesteraz-9 selektif inhibitörleri

- Zaprinast

Fosfodiesteraz-11 selektif inhibitörleri

- Dipiridamol
- Zaprinast

5.2. TADALAFİL

Tadalafil, erkek erektil disfonksiyonda oral yoldan kullanılan bir ajandır (71). Cialis® (Lilly ICOS LLC) ticari adıdır. Sarı renkli, film kaplı, badem şeklindedir ve 5, 10, 20 miligramlık dozlarda üretilmektedir.

Aralık 2003 tarihinde Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi onayı almıştır. Sildenafil (Viagra®) ve verdenafil (Levitra®) sonrasında piyasaya sürülen üçüncü impotans ajanıdır. 36 saatlik yarı ömrü ve etkisi nedeniyle *haftasonu hapı* da denmektedir. Tadalafil, ayrıca, pulmoner arteriyel hipertansiyon tedavisinde faz 3 klinik çalışmalarda da denenmektedir.

1998'de onayı alan Viagra tüm dünyada erektil disfonksiyon tedavisinde inanılmaz bir başarı elde etmiş ve yaygınlık kazanmıştır. Bunun sonrasında, değişik firmalar değişik formlarda ve yarı ömürlerde fosfodiesteraz-5 enzim inhibitörleri geliştirmişler ve piyasaya sürmüşlerdir.

Tadalafil, diğerleri gibi fosfodiesteraz-5 enzim inhibisyonu yaparak etki göstermektedir. Ancak en belirgin avantajı 17,5 saat gibi uzun bir yarı ömre sahip olmasıdır. Diğer fosfodiesteraz-5 selektif inhibitörleri olan sildenafil ve verdenafil 4-5 saat yarı ömürlüdür. Bundan dolayı tadalafilin günde bir tane alınması yeterlidir.

Tadalafilin erektil disfonksiyondaki etkisini anlamak için ereksiyon fizyolojisi bilinmelidir. *Seksüel uyarı varlığında* penil ereksiyonun olması için penil arterlerin ve korpus kavernozum düz kaslarının gevşemesi ve penil kan akımının artması gerekmektedir. Bu uyarı, sinir uçları ve endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit (NO) aracılı olmaktadır. NO, düz kas hücrelerinde cGMP sentesini uyarmaktadır. cGMP, düz kası gevşetmekte (hücre içi kalsiyum seviyesini düşürerek) ve korpus kavernozum kan akımını artırmaktadır. Fosfodiesteraz-5 selektif inhibitörleri cGMP AMP dönüşümünü bloke ederek cGMP miktarını artırmaktadır (71,72).

5.3. FOSFODİESTERAZ-5 İNHİBİTÖRLERİNİN KLİNİK ETKİLERİ

5.3.1. EREKTİL DİSFONKSİYON ÜZERİNE ETKİLER

Yapılan çok merkezli çalışmalarda tadalafilin kronik kullanımının erektil disfonksiyonlu hastalarda etkisi araştırılmıştır. Diyabetik olan ED hastalarında, diyabetin tipi, tedavi protokolü, glisemi kontrolü ve mikrovasküler komplikasyon varlığından bağımsız olarak tadalafilin etkinliği değerlendirilmiş ve ED'nin gelişme gösterdiği bulunmuştur (112, 113).

Tadalafilin ED olan yaşlı hastalardaki (>65 yaş) etkinliği de araştırılmış ve plaseboya göre (%22) %69'luk bir klinik başarı elde edilmiştir (114).

Tadalafil, ED dışında üriner sistem üzerine etki göstermektedir. Kavernoza sinir rezeksiyonu yapılmış ratlarda kronik günlük tadalafil kullanımının korpus kavernoza fibrozisini ve veno-oklüzif disfonksiyonu önlediği gösterilmiştir (115).

Fosfodiesteraz-5 enzim inhibitörleri alt üriner sistem üzerinde de etki göstermektedir. Böylece yalnız ED için değil alt üriner sistem şikayetleri (üriner sıklık, "urgency", noktüri) olanlarda da faydası mevcuttur (116-119). ED, benign prostat hipertrofisi olan hastalarda sıklıkla komorbiddir (120). Yapılan çalışmalar, alt üriner sistem rahatsızlığı olanlarda sildenafil ve tadalafilin olumlu etki gösterdiği yönündedir (121-123). Bunun dışında fosfodiesteraz-5 enzimi mesanede de mevcut olduğundan mesane disfonksiyonlarında ve neden olduğu şikayetlerde de kullanılabilir (116, 124, 125).

Tadalafil, önceleri erektil disfonksiyonun tedavisinde uzun ömürlü ajan olarak kullanılmıştır. Zamanla nonerektojenik etkilerinin de olduğu görülmüştür.

5.3.2. AKCİĞER ÜZERİNE ETKİLER

Normal akciğerde NO, pulmoner endotelden salınarak kan akımındaki lokal değişikliklerin kontrolü, normal pulmoner vasküler tonun ve geçirgenliğinin sağlanması, oksijen transferine doku direncinin modülasyonu gibi önemli fizyolojik olaylara aracılık etmektedir (113, 127). Pulmoner hipertansiyonda ise sol kalp dolum basıncı ve pulmoner vasküler direnç artmaktadır. Mevcut bilgiler primer pulmoner hipertansiyon olan hastalarda endotel kaynaklı vazodilatör araçlar (prostaglandin I₂, NO) ile vazokonstriktör araçlar (endotelin-1, tromboksan A₂) arasındaki dengesizlik olduğu yönündedir. Sekonder pulmoner hipertansiyon ise sekonder bir hastalığa (kalp yetmezliği, akut solunum distres sendromu, akciğer transplantasyonu, akciğer embolisi) bağlı gelişmektedir.

Fosfodiesteraz-5 enzimi akciğerde yaygın olarak bulunmaktadır. Enzim inhibisyonunun da klinik etkileri yoğun olarak araştırılmıştır (128). Bir çalışmada sildenafilin kronik kullanımı ile pulmoner sistolik basınçta %21.8, diyastolik basınçta %20.8 ve arteriyel dirençte ise %45.1'lik bir azalma gösterilmiştir. Diğer bir çalışmada ise sildenafil, NO ile kullanılmış ve başarılı sonuçlar alınmıştır (128, 129). Tadalafilin bu amaçla kullanım henüz yenidir. Bir çalışmada 6 aylık tadalafil kullanımıyla 72 yaşındaki bir pulmoner hipertansiyon hastasında fonksiyonel durum (NYHA sınıflandırmasına göre) ve arteriyel oksijenizasyonda düzelme ve sistolik pulmoner basınçta düşme görülmüştür (130). Başka bir çalışmada ise 55 yaşında siroz ve primer pulmoner hipertansiyon hastasında tadalafil kullanımı ile egzersiz kapasitesinde ve kalp veriminde artış, pulmoner arteriyel basınçta, hepatik köşe ven basıncında ve sistolik-diyastolik kan basıncında düşüş tespit edilmiştir (131).

5.3.3. KALP ÜZERİNE ETKİLER

ED, ateroskleroz, hipertansiyon, dislipidemi, diabetes mellitus, sigara içiciliği, obezite ve sekonder yaşama tarzı gibi birçok modifiye edilebilen risk faktörlerini paylaşmaktadır (132, 133).

Kalp kası üzerine olan kontraktıl etkileri için net bir bilgi verilememekte; daha çok çalışma gerektiği bildirilmiştir. Ancak periferal ve santral hemodinamik etkileri üzerine yapılan çalışmalar çoktur. ED hastası ve iskemik kalp hastalığı olan hastalarda yapılan plasebo kontrollü, çift kör bir meta-analizde sildenafilin ED üzerine anlamlı etkisinin olduğu gösterilmiştir (134).

Çeşitli çalışmalar göstermiştir ki oral sildenafil kullanımı ile 1-2 saat içinde küçük sistolik ve diyastolik basınç düşüşleri olmakta ve ilginçtir ki bu yaş ve ilaç dozundan bağımsız görülmektedir. Genç-yaşlı kıyaslanmasında ortostatik kan basınç farklılıkları gözlemlenmemiştir. Bir çalışmada antihipertansif ajanlarını kullanan hastalarda sildenafil ile kan basıncı değişiklikleri olmakta ancak kalp hızına etki olmamaktadır (135). Fosfodiesteraz-5 inhibitörleri eş zamanlı antihipertansif ajanlarla (β -blokörler, kalsiyum kanal blokörleri, anjiyotensin dönüştürücü enzim inhibitörleri) beraber kullanılabilir. Yalnız, α -blokörler ve NO ajanları ile beraber kullanılırken vazodilatasyon ve hipotansiyon yönünden dikkatli olunmalıdır. Fosfodiesteraz-5 inhibitörleri, koroner arter hastası ve kritik stenozu olan hastalarda NO ajanları ile beraber kullanılmamalıdır.

Sildenafilin izole edilmiş kanin koroner arter düz kasları üzerinde seçici olarak cGMP seviyelerini artırarak etki ettiği gösterilmiştir. Bu etkilerini, 10-100 nM konsantrasyonlarında göstermekte, fazla dozlarda etki göstermemektedir. Bir çalışmada, sildenafilin köpek koroner kan akımı üzerinde istirahat ve egzersizdeki etkileri incelenmiştir. Sonuç olarak koroner akımı artırdığı gösterilmiştir (136). Başka bir çalışmada ise insanlar üzerindeki etkisi incelenmiş ve koroner akımda değişiklik bulunmamış; fakat, koroner akım rezervlerinde anlamlı artış görülmüştür. Bunların sonucunda nitratların aksine sildenafilin koroner çalma fenomeni oluşturmadığı görülmüştür (137).

Kronik kalp yetmezliği (KKY) olan hastalarda %75 ED eşlik edebilmektedir. Bocchi ve arkadaşları KKY olan hastalarda sildenafilin ED üzerine olumlu etkilerini göstermiştir (138). KKY olan hastalarda sildenafil kullanımı ile ilgili çok rapor mevcuttu ancak henüz verdenafil ve tadalafil ile yapılmış etkinlik-sonuç raporu görülmemiştir (139). Verdenafilin tavşanda iskemi/reperfüzyon hasarı sonrası

miyokard nekroz miktarını mitokondri kaynaklı K_{ATP} kanallarını açarak azalttığı gösterilmiştir (140). Şu bilinmektedir ki stabil KKY olan ED hastalarında sildenafil etkili ve güvenilirdir (72).

Çalışmalar, sildenafilin kardiyoprotektif etkisini yalnızca vazodilatör etkisine bağlamamakta, iskemik “preconditioning”, endotel üzerine olan, nekroz ve apoptoz azaltıcı, aort üzerine olan, β -adrenerjik enzim regülasyonuna olan, ventriküler “remodelling”, anti-iskemik, aritmi azaltıcı, miyokard enfarktüsü azaltıcı, mikrovasküler fonksiyon üzerine olan ve miyokard iskemi/reperfüzyon üzerine olan etkilerine bağlamaktadır (72, 141-146).

5.3.4. DİĞER ORGAN SİSTEMLERİ ÜZERİNE ETKİLER

5.3.4.1. TROMBOSİTLER ÜZERİNE ETKİLER

Trombositler, fosfodiesteraz-3 ve 5 enzimlerini taşırlar. İlk çalışmalarda trombositler üzerine etki görülmezken artık bilinmektedir ki NO donörleriyle beraber *ex vivo* ve *in vitro* olarak sildenafilin antiagregan etkisi vardır (147, 148). Ancak sildenafilin kanama bozukluğu olan veya anti-trombosit ajan (klopidogrel, tiklopidin, dipiridamol) kullanan hastalarda etkisi henüz değerlendirilmediğinden eşzamanlı kullanımında dikkatli olunmalıdır.

5.3.4.2. GASTROİNTESTİNAL SİSTEM ÜZERİNE ETKİLER

Bu konuda yapılan çalışmalar çoğunlukla hayvan deneyleri sonucudur. Bir çalışmada sildenafilin rat düodenal kontraktilesi üzerinde *in vitro* inhibitör etkisi görülmüştür (149). Başka bir çalışmada ise kedi özafagusunda hem kontraksiyonları azalttığı hem de alt sfinkter gevşemesi yaptığı gösterilmiştir (150). Ayrıca sildenafilin postprandial mide hacmini artırdığı ve sıvıların geçiş süresini uzattığı bulunmuştur (151). *In vitro* çalışmalar etkinin NO aracılı düz kas gevşemesi,

peristaltizm azalması ve sfinkter gevşekliği yapması (myojenik etkiler) nedeniyle olduğu yönündedir (72).

5.3.4.3. ENDOTEL ÜZERİNE ETKİLER

Çalışmalar, endotel disfonksiyonunun endotel kaynaklı NO üretimindeki azalma sonucu oluştuğunu göstermektedir. Endotel fonksiyonunun, KKY, diabetes mellitus ve koroner arter hastası olanlarda etkilendiği bilinmektedir (152). Hayvan çalışmalarında sildenafilin endotel fonksiyonu üzerine olumlu etkileri gösterilmiş; insanlarda da miyokard hasarını azalttığı, bunu da endotel fonksiyonları üzerinden yaptığı görülmüştür (153, 154). Hatta, tadalafilin de yüksek kardiyovasküler risk taşıyan hastalarda endotel fonksiyonunu iyileştirdiği ve etkinin de ilaç bırakılsa dahi 2 hafta sürdüğü raporlanmıştır (155). Öte yandan, sigara içicilerde endotel disfonksiyonunu azaltıcı etkiler net değildir. Bir çalışmada brakial arterde anlamlı akım farkı bulunmazken (156), başka bir çalışmada sildenafilin sigara kaynaklı akut akım değişikliklerini bile ortadan kaldırdığı bulunmuştur (157). Bu etkinin de KKY hastalarında damar düz kaslarında cGMP aracılı gevşemeye cevap azlığından kaynaklandığını; sildenafil ile de bu cevabın artırıldığı gösterilmiştir.

Çalışmalar, endotel disfonksiyonu üzerine tadalafilin olumlu etkisinin olduğunu göstermiştir (158-161). Yüksek kardiyovasküler risk taşıyan erkeklerde kronik tadalafil kullanımının (20 mg) endotel fonksiyonlarını iyileştirdiği gösterilmiştir (155). Bu çalışmada, ayrıca, kronik tadalafil kullanımının brakial arter akım artışına, vazodilatasyona neden olduğu; ek olarak da endotelin-1 seviyesini düşürdüğü ve nitrit/nitrat seviyesini artırdığı raporlanmıştır.

5.3.4.4. GÖRME ÜZERİNE ETKİLER

Sildenafil, fosfodiesteraz-5 enzimine fosfodiesteraz-6 enziminden 10 kat daha seçicilik gösterdiğinden ilacın yüksek plazma konsantrasyonlarında görme üzerine olan etkileri bu seçiciliğe bağlanmaktadır (162, 163). Mavi-yeşil görme, ışık

algılanmasında artış, bulanık görme gibi geçici görsel anormallikler (164) ilacın yüksek dozlarında ortaya çıkmaktadır (sildenafil >100mg). Fosfodiesteraz-6 enzim defekti olan retinitis pigmentosa gibi hastalıklarda ilaç dikkatle kullanılmalıdır. Çalışmalar, fosfodiesteraz-5 inhibitörleri ile nonarteritik anterior iskemik optik nöropati (NAION), siloretinal arter tıkanıklığı (165) ve pupilin etkilenmediği III. kraniyal sinir felci (166) arasında temporal bir ilişki olduğunu göstermektedir ve bunlar yüksek doz kullanımı nedeniyle olmaktadır. NAION, ani gelişen, tedavisi olmayan, geri dönüşümsüz görme kaybıdır ve 40 yaşından büyüklerde görülmektedir. Optik disk ödemi, sinir liflerinde hemoraji, afferent papiller defekt ve görme kaybı izlenmektedir. 50 yaşının üzerinde 100000'de 2.5 oranında insidans verilmektedir (167). Son çalışmalar ED için enzim inhibitörü kullanan erkeklerde NAION insidansında artma olmadığını göstermektedir (72).

5.3.4.5. SEREBRAL KAN AKIMI ÜZERİNE OLAN ETKİLER

Fosfodiesteraz-5 enzimi beyinde özellikle beyincik, hipokampus ve superior servikal ganglionda bulunmaktadır (168). Yapılan çalışmalar, enzim inhibitörlerinin serebral damarlarda etki etmediği ve serebral akımda ve hızında değişikliğe neden olmadığı yönündedir (169, 170). Buna neden olarak serebral damar düz kaslarında cGMP etkisinin olmadığı veya kompensatuar mekanizmaların devreye girdiği gösterilmektedir.

5.3.5. FLEP YAŞABİLİRLİĞİ ÜZERİNE OLAN ETKİLER

Bu konuda yapılan çalışmalar oldukça azdır. 2008 başında yapılan bir çalışmada aksiyel paternli cilt flebinde tadalafilin nekrozu anlamlı derecede azalttığı gösterilmiştir (171). Bu etkileri sadece düz kas gevşetici etkisiyle değil kombine sistem etkileriyle gerçekleştirdiği düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Tadalafil kullanımı, iskemi oluşturulmuş cilt fleplerinde reperfüzyona bağlı hasarı azaltmaktadır. Bu da global iskemiye maruz kalan dokularda tadalafilin anatomik ve fonksiyonel iyileşmede etkin olabilecekleri sonucunu doğurmaktadır. Serbest flep cerrahisi veya replantasyon olgularında olduğu gibi geçici bir süre global iskemi sonrası reperfüzyonun zorunlu olarak yaşandığı operasyonlarda ameliyat öncesi ve sonrası sistemik dolaşımında belirli bir seviyede tadalafil düzeyinin olması, karmaşık mekanizmalar sonucu ortaya çıkan iskemi / reperfüzyon hasarının azaltılmasında ve cerrahi girişimlerin başarısının artması ve komplikasyon oranlarının düşürülmesinde faydalı bir yöntem olarak uygulanabileceği sonucuna varılmıştır.

7. ÖZET

İyatrojenik olarak planlanmış serbest doku transferlerinde olduğu gibi çeşitli kazalar sonucu oluşan uzuv kopmalarında da insan vücudunun anatomik bir parçası vücuttan uzaklaşmakta ve kan akımı belirli bir süre için de olsa kesintiye uğramaktadır. Doku veya organ kan akımı yeniden sağlansa bile özellikle serbest oksijen radikallerinin sebep olduğu iskemi / reperfüzyon hasarı' değişken seviyelerde hücre ve doku hasarına sebep olmakta ve fonksiyonel olarak kayıplar ile sonuçlanmaktadır. İskemi / reperfüzyon hasarını azaltmaya yönelik çalışmalar halen devam etmekte ancak halen klinik rutin kullanıma geçmiş tam olarak etkin bir madde bulunmuş değildir.

Hipotezimiz oksidatif strese karşı tadalafil kullanımının oluşabilecek hasarı azaltmada etkili olabileceği idi. Bu amaçla bu çalışmada daha önceden deneysel olarak dizayn edilmiş bir cilt ada flebi iskemi / reperfüzyon modelinde tadalafilin koruyucu etkisini araştırmayı amaçladık. 60 sıçan üzerinde yapılan deneysel çalışmada sıçanlar önce üç alt gruba ayrıldı. Tüm sıçanların karın / kasık bölgesinden 7 x 4 cm'lik cilt ada flepleri hazırlandı. I. gruptaki sıçanların flepleri eleve edilip yerine iade edildi. II. gruptaki sıçanların fleplerine iskemi / reperfüzyon modeli uygulandı ve herhangi bir tedavi uygulanmadı. III. gruptaki sıçanların fleplerine iskemi reperfüzyon modeli uygulandı ve günlük 5 mg/kg dozunda tadalafil verildi. Her üç gruptaki sıçanların yarısı reperfüzyonun 12. saatinde ve diğer yarısı 7. günde sakrifiye edilerek makroskopik nekroz alan ölçümü, biyokimyasal araştırmalar ve histopatolojik incelemeler gibi objektif ölçüm yöntemleri kullanılarak birbirleriyle kıyaslandı. Tadalafil kullanılan gruplardaki biyokimyasal ölçümler, alan ölçümleri ve histopatolojik incelemelerin oldukça olumlu sonuçlar verdiği görüldü. Daha önce tadalafilin flep cerrahisinde kullanıldığı çalışmalar mevcuttur, ancak, mikro cerrahide veya replantasyon cerrahisinde, cilt iskemi / reperfüzyon hasarındaki etkisi ile ilgili herhangi bir deneysel veya klinik çalışma mevcut değildir. Yaptığımız çalışma ışığında tadalafilin mikro cerrahi ve flep cerrahisinde oksidatif hasarı azalttığı ve cerrahi girimlerin başarı oranını arttırdığı sonucuna varılmıştır.

8. KAYNAKLAR

1. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24(6):468-75.
2. Kerrigan CL, Zelt RG, Daniel RK. Secondary critical ischemia time of experimental skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1984;74(4):522-6.
3. Zelt RG, Olding M, Kerrigan CL, Daniel RK. Primary and secondary critical ischemia times of myocutaneous flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1986;78(4):498-503.
4. Schlenker JD, Reus WF. Blood flow after warm ischemia in island flaps: latissimus dorsi myocutaneous and epigastric flaps in the dog. *Ann Plast Surg*. 1983;10(1):55-64.
5. Khiabani KT, Kerrigan CL. Differing flow patterns between ischemically challenged flap skin and flap skeletal muscle: implications for salvage regimens. *Plast Reconstr Surg*. 2002;109(1):220-7.
6. Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J. Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg*. 1994;93(7):1485-95.
7. Morris SF, Pang CY, Zhong A, Boyd B, Forrest CR. Assessment of ischemia-induced reperfusion injury in the pig latissimus dorsi myocutaneous flap model. *Plast Reconstr Surg*. 1993;92(6):1162-72.
8. Carroll WR, Esclamado RM. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck*. 2000;22(7):700-13.

9. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg.* 1983;198(1):87-90.
10. Im MJ, Shen WH, Pak CJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effect of allopurinol on the survival of hyperemic island skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1984;73(2):276-8.
11. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg.* 1985;201(3):357-9.
12. Angel MF, Narayanan K, Swartz WM, Ramasastry SS, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. Deferoxamine increases skin flap survival: additional evidence of free radical involvement in ischaemic flap surgery. *Br J Plast Surg.* 1986;39(4):469-72.
13. Huang L, Privalle CT, Serafin D, Klitzman B. Increased survival of skin flaps by scavengers of superoxide radical. *FASEB J.* 1987;1(2):129-32.
14. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Narayanan K, Kuhns DB, Basford RE, Futrell JW. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plast Reconstr Surg.* 1988;81(2):233-9.
15. Kim YS, Im MJ, Hoopes JE. The effect of a free-radical scavenger, N-2-mercaptopyrionylglycine, on the survival of skin flaps. *Ann Plast Surg.* 1990;25(1):18-20.
16. Knight KR, Angel MF, Lepore DA, Abbey PA, Arnold LI, Gray KA, Mellow CG, O'Brien BM. Secondary ischaemia in rabbit skin flaps: the roles played by thromboxane and free radicals. *Clin Sci (Lond).* 1991;80(3):235-40.

17. al-Qattan MM. Ischaemia-reperfusion injury. Implications for the hand surgeon. *J Hand Surg [Br]*. 1998;23(5):570-3.
18. Maier CM, Chan PH. Role of superoxide dismutases in oxidative damage and neurodegenerative disorders. *Neuroscientist*. 2002;8(4):323-34.
19. Suzuki S, Matsushita Y, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y. Salvage of distal flap necrosis by topical superoxide dismutase. *Ann Plast Surg*. 1991;27(3):253-7.
20. Stotland MA, Kerrigan CL. The role of platelet-activating factor in musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 1997;99(7):1989-99
21. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA, Chiao JJ, Davis JM, Fantini GA. Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg*. 1997;99(6):1485-93
22. Lee C, Kerrigan CL. Neutrophil localization following reperfusion of ischemic skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 1992;89(5):910-5.
23. Iwahori Y, Ishiguro N, Shimizu T, Kondo S, Yabe Y, Oshima T, Iwata H, Sendo F. Selective neutrophil depletion with monoclonal antibodies attenuates ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle. *J Reconstr Microsurg*. 1998;14(2):109-16.
24. Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ. Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adherence. *Circ Res*. 1990;66(5):1436-44.
25. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery*. 1993;14(3):165-75.

26. Weiss SJ. Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med.* 1989 9;320(6):365-76.
27. Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand.* 1980;108(2):159-63.
28. Jassem W, Fuggle SV, Rela M, Koo DD, Heaton ND. The role of mitochondria in ischemia/reperfusion injury. *Transplantation.* 2002;73(4):493-9.
29. Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(4):442-7.
30. Remick DG. Cytokines: a primer for plastic surgeons. *Ann Plast Surg.* 1995;35(5):549-59.
31. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, Bulkley GB, Hoopes JE. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg.* 1983;198(1):87-90.
32. Parks DA, Bulkley GB, Granger DN. Role of oxygen free radicals in shock, ischemia, and organ preservation. *Surgery.* 1983;94(3):428-32.
33. Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during induced lipid peroxidation. *FEBS Lett* 1997; 408(3): 297-300.
34. Trimarchi H, Mongitore MR, Baglione P, et al. N-acetylcysteine reduces malondialdehyde levels in chronic hemodialysis patients—a pilot study. *Clin Nephrol.* 2003; 59(6): 441-446.

35. Freudenthaler SM, Schreeb KH, Wiese A, Pilz J, Gleiter CH. Influence of controlled hypoxia and radical scavenging agents on erythropoietin and malondialdehyde concentration in humans. *Acta Physiol Scand* 2002; 174(3): 231-235.
36. Aganval R. Proinflammatory effects of oxidative stress in chronic kidney disease: role of additional angiotensin 11 blockade. *Am J Physiol* 2003; 284(4): F863-F869.
37. Deune EG, Koopman R, Smith ME, Hong SP, Ozbek MR, Khouri RK. Prevention of ischemia-reperfusion injury with a synthetic metalloprotein superoxide dismutase mimic, SC52608. *Plast Reconstr Surg*. 1996;98(4):711-8.
38. Maeda M, Fukui A, Tamai S. Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps. *J Reconstr Microsurg*. 1991;7(3):233-43.
39. Porteous CM, Murphy MP. Superoxide production by mitochondria in the presence of nitric oxide forms peroxynitrite. *Biochem Mol Biol Int*. 1996;40(3):527-34.
40. 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.
41. Anaya-Prado R, Toledo-Pereyra LH, Lentsch AB, Ward PA. Ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res*. 2002;105(2):248-58.
42. Becker M, Menger MD, Lehr HA. Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Am J Physiol*. 1994;267(3 Pt 2):H925-30.

43. Yamaguchi T, Oishi K, Uchida M, Echizen H. Edaravone, a radical scavenger, may enhance or produce antiproliferative effects of fluvastatin, amlodipine, ozagrel, GF109203X and Y27632 on cultured basilar artery smooth muscle cells. *Biol Pharm Bull.* 2003;26(12):1706-10.
44. Fernandez N, Martinez MA, Climent B, Garcia-Villalon AL, Monge L, Sanz E, Dieguez G. In vivo coronary effects of endothelin-1 after ischemia-reperfusion. Role of nitric oxide and prostanoids. *Eur J Pharmacol.* 2003;481(1):109-17.
45. Guo JP, Murohara T, Buerke M, Scalia R, Lefer AM. Direct measurement of nitric oxide release from vascular endothelial cells. *J Appl Physiol.* 1996;81(2):774-9.
46. Lefer AM, Lefer DJ. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1996;32(4):743-51.
47. Mollnes TE, Song WC, Lambris JD. Complement in inflammatory tissue damage and disease. *Trends Immunol.* 2002;23(2):61-4.
48. Darley-USmar VM, Stone D, Smith DR. Oxygen and reperfusion damage: an overview. *Free Radic Res Commun.* 1989;7(3-6):247-54.
49. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg.* 2002;10(6):620-30.
50. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190(3):255-66.
51. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Ma LL, Shen J, Foster P, Williams JW. Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation-reperfusion injury in rats. *Transplantation.* 1998;66(2):152-7.

52. Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation*. 1986;74(5):1124-36.
53. Glazier SS, O'Rourke DM, Graham DI, Welsh FA. Induction of ischemic tolerance following brief focal ischemia in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab*. 1994;14(4):545-53.
54. Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. *Cardiovasc Res*. 1995;29(6):782-8.
55. Domenech RJ, Sanchez G, Donoso P, Parra V, Macho P. Effect of tachycardia on myocardial sarcoplasmic reticulum and Ca²⁺ dynamics: a mechanism for preconditioning? *J Mol Cell Cardiol*. 2003;35(12):1429-37.
56. Vegh A, Szekeres L, Parratt J. Preconditioning of the ischaemic myocardium; involvement of the L-arginine nitric oxide pathway. *Br J Pharmacol*. 1992;107(3):648-52.
57. Gattullo D, Linden RJ, Losano G, Pagliaro P, Westerhof N. Ischaemic preconditioning changes the pattern of coronary reactive hyperaemia in the goat: role of adenosine and nitric oxide. *Cardiovasc Res*. 1999;42(1):57-64.
58. Leesar MA, Stoddard MF, Dawn B, Jasti VG, Masden R, Bolli R. Delayed preconditioning-mimetic action of nitroglycerin in patients undergoing coronary angioplasty. *Circulation*. 2001;103(24):2935-41.
59. Ammes A, Wright RL, Kowada M, Thirsten JM, Majno G. Cerebral ischemia II: The 'no-reflow' phenomenon. *Am J Pathol*. 1968;52: 437-53.

60. Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock*. 1997;8(1):2-7.
61. Kinnunen I, Laurikainen E, Schrey A, Laippala P, Aitasalo K. Effect of hypothermia on blood-flow responses in pedicled groin flaps in rats. *Br J Plast Surg*. 2002;55(8):657-63.
62. Cankar K, Arnez ZM, FINDERLE Z, STRUCL M. Microvascular skin response to local cooling and body tilt early after digital replantation. *J Hand Surg [Am]*. 2000;25(3):552-8.
63. Hayhurst JW, O'Brien BM, Ishida H, Baxter TJ. Experimental digital replantation after prolonged cooling. *Hand*. 1974;6(2):134-41.
64. <http://en.wikipedia.org/wiki/Tadalafil>
65. Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Kirilovsky J, Hyafil F, Labaudinière R. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 1: 5,6,11,11a-tetrahydro-1H-imidazo[1',5':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,3(2H)-dione analogues. *J Med Chem*. 2003 Oct 9;46(21):4525-32.
66. Daugan A, Grondin P, Ruault C, Le Monnier de Gouville AC, Coste H, Linget JM, Kirilovsky J, Hyafil F, Labaudinière R. The discovery of tadalafil: a novel and highly selective PDE5 inhibitor. 2: 2,3,6,7,12,12a-hexahydropyrazino[1',2':1,6]pyrido[3,4-b]indole-1,4-dione analogues. *J Med Chem*. 2003 Oct 9;46(21):4533-42.
67. <http://www2.epocrates.com/index.html>
68. Francis SH, Lincoln TM, Corbin JD. Characterization of a novel cGMP binding protein from rat lung. *J Biol Chem*. 1980 Jan 25;255(2):620-6.

69. Yanaka N, Kotera J, Ohtsuka A, Akatsuka H, Imai Y, Michibata H, Fujishige K, Kawai E, Takebayashi S, Okumura K, Omori K. Expression, structure and chromosomal localization of the human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase PDE5A gene. *Eur J Biochem.* 1998 Jul 15;255(2):391-9.
70. Broughton BJ, Chaplen P, Knowles P, Lunt E, Pain DL, Wooldridge KR, Ford R, Marshall S, Walker JL, Maxwell DR. New inhibitor of reagin-mediated anaphylaxis. *Nature.* 1974 Oct 18;251(5476):650-2.
71. Kulkarni SK, Patil CS. Phosphodiesterase 5 enzyme and its inhibitors: update on pharmacological and therapeutical aspects. *Methods Find Exp Clin Pharmacol.* 2004 Dec;26(10):789-99.
72. Schwarz ER, Kapur V, Rodriguez J, Rastogi S, Rosanio S. The effects of chronic phosphodiesterase-5 inhibitor use on different organ systems. *Int J Impot Res.* 2007 Mar-Apr;19(2):139-48.
73. Petry JJ, Wortham KA. The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. *Plast Reconstr Surg* 1984; 74: 410-413.
74. Kuo YR, Jeng SF, Wang FS et al. Platelet glycoprotein IIb/IIIa receptor antagonist (abciximab) inhibited platelet activation and promoted skin flap survival after ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res* 2002; 107: 50-55.
75. Gurlek A, Celik M, Parlakpinar H, Aydogan H, Bay-Karabulut A. The protective effect of melatonin on ischemia-reperfusion injury in the groin (inferior epigastric) flap model in rats. *J Pineal Res.* 2006 May;40(4):312-7
76. Smarason AK, Allman KG, Young D, Redman CW. Elevated levels of serum nitrate, a stable end product of nitric oxide, in women with pre-eclampsia. *Br J Obstet Gynaecol.* 1997 May;104(5):538-43

77. Wasowicz W, Neve J, Peretz A. Optimized steps in fluorometric determination of thiobarbituric acid-reactive substance in serum: Importance of extraction pH and influence of sample preservation and storage. *Clin Chem* 1993; 39: 2522-2526.
78. Bradley PP, Priebat DA, Christensen RD, Rothstein G. Measurement of cutaneous inflammation: estimation of neutrophil content with an enzyme marker. *J Invest Dermatol.* 1982 Mar;78(3):206-9.
79. Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. *Microsurgery.* 1993;14(3):165-75.
80. Pang CY, Forrest CR, Mounsey R. Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery.* 1993;14(3):176-82.
81. Francel TJ, Vander Kolk CA, Yaremchuk MJ. Locally applied hypothermia and microvascular muscle flap transfers. *Ann Plast Surg.* 1992;28(3):246-51.
82. Kihira M, Miura T, Ishiguro N. Preservation of skeletal muscle in tissue transfers using rat hindlimbs. *Plast Reconstr Surg.* 1991;88(2):275-84.
83. Sapega AA, Heppenstall RB, Sokolow DP, Graham TJ, Maris JM, Ghosh AK, Chance B, Osterman AL. The bioenergetics of preservation of limbs before replantation. The rationale for intermediate hypothermia. *J Bone Joint Surg Am.* 1988;70(10):1500-13.
84. Zhan CW, Suzuki Y, Kitahara AK, Wada H, Nishimura Y. Prolongation of ischaemic tolerance of rat skeletal muscle by trehalose. *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg.* 1997;31(3):197-201.
85. Rosen HM, Slivjak MJ, McBrearty FX. The role of perfusion washout in limb revascularization procedures. *Plast Reconstr Surg.* 1987;80(4):595-605.

86. Gordon L, Levinsohn DG, Borowsky CD, Manojlovic RD, Sessler DI, Weiner MW, Baker AJ. Improved preservation of skeletal muscle in amputated limbs using pulsatile hypothermic perfusion with University of Wisconsin solution. A preliminary study. *J Bone Joint Surg Am.* 1992;74(9):1358-66.
87. Ablove RH, Moy OJ, Peimer CA, Severin CM, Sherwin FM. Effect of high-energy phosphates and free radical scavengers on replant survival in an ischemic extremity model. *Microsurgery.* 1996;17(9):481-6.
88. Carroll CM, Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH. Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle-flap survival. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(1):58-65.
89. Yin DP, Sankary HN, Chong AS, Blinder L, Ma LL, Williams JW. Effect of anti-CD4 monoclonal antibody combined with human CTLA4Ig on the survival of hamster liver and heart xenografts in Lewis rats. *Transplantation.* 1997;64(2):317-21.
90. Grover GJ, Newburger J, Sleph PG, Dzwonczyk S, Taylor SC, Ahmed SZ, Atwal KS. Cardioprotective effects of the potassium channel opener cromakalim: stereoselectivity and effects on myocardial adenine nucleotides. *J Pharmacol Exp Ther.* 1991;257(1):156-62.
91. Thornton JD, Liu GS, Olsson RA, Downey JM. Intravenous pretreatment with A1-selective adenosine analogues protects the heart against infarction. *Circulation.* 1992;85(2):659-65.
92. Korompilias AV, Chen LE, Seaber AV, Urbaniak JR. Actions of glucocorticosteroids on ischemic-reperfused muscle and cutaneous tissue. *Microsurgery.* 1996;17(9):495-502.

93. Weiss AP, Carey LA, Randolph MA, Moore JR, Weiland AJ. Oxygen radical scavengers improve vascular patency and bone-muscle cell survival in an ischemic extremity replant model. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84(1):117-23.
94. Thomas DW, O'Neill ID, Harding KG, Shepherd JP. Cutaneous wound healing: a current perspective. *J Oral Maxillofac Surg.* 1995;53(4):442-7.
95. Stotland MA, Kerrigan CL. The role of platelet-activating factor in musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(7):1989-99
96. Lee C, Kerrigan CL. Ibuprofen treatment of ischemic musculocutaneous flaps. *Ann Plast Surg.* 1994;32(3):300-4.
97. Winn RK, Liggitt D, Vedder NB, Paulson JC, Harlan JM. Anti-P-selectin monoclonal antibody attenuates reperfusion injury to the rabbit ear. *J Clin Invest.* 1993;92(4):2042-7.
98. Stotland MA, Kerrigan CL. E- and L-selectin adhesion molecules in musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(7):2010-20.
99. Zamboni WA, Stephenson LL, Roth AC, Suchy H, Russell RC. Ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: CD 18-dependent neutrophil-endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(7):2002-7.
100. Ma XL, Lefer DJ, Lefer AM, Rothlein R. Coronary endothelial and cardiac protective effects of a monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 in myocardial ischemia and reperfusion. *Circulation.* 1992;86(3):937-46.

101. Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen. *Plast Reconstr Surg.* 1993;91(6):1110-23.
102. Wang WZ, Anderson G, Acland RD, Barker J. Endothelin-1 does not contribute to ischemia/reperfusion-induced vasoconstriction in skeletal muscle. *J Reconstr Microsurg.* 1997;13(6):439-47.
103. Wang WZ, Anderson G, Fleming JT, Peter FW, Franken RJ, Acland RD, Barker J. Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99(4):1099-108.
104. Cordeiro PG, Mastorakos DP, Hu QY, Kirschner RE. The protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skin flaps. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100(5):1227-33.
105. Joneschild ES, Chen LE, Seaber AV, Frankel ES, Urbaniak JR. Effect of a NOS inhibitor, L-NMMA, on the contractile function of reperfused skeletal muscle. *J Reconstr Microsurg.* 1999;15(1):55-60.
106. Knox LK, Angel MF, Gamper T, Amiss LR, Morgan RF. Secondary ischemic tolerance improved by administration of L-NAME in rat flaps. *Microsurgery.* 1996;17(8):425-7.
107. Oshima H, Inoue H, Aihara M, Tomioka M, Ishida H. Physiological roles of endothelium-derived nitric oxide in the epigastric island flaps of rabbits. *Ann Plast Surg.* 1997;39(6):608-14.
108. Uzunov, P. and Weiss, B.: Separation of multiple molecular forms of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate phosphodiesterase in rat cerebellum by polyacrylamide gel electrophoresis. *Biochim. Biophys. Acta* 1972; 284:220-226.

109. Weiss, B.: Differential activation and inhibition of the multiple forms of cyclic nucleotide phosphodiesterase. *Adv. Cycl. Nucl. Res.* 1975; 5:195-211.
110. Fertel, R. and Weiss, B.: Properties and drug responsiveness of cyclic nucleotide phosphodiesterases of rat lung. *Mol. Pharmacol.* 1976; 12:678-687.
111. Weiss, B. and Hait, W.N.: Selective cyclic nucleotide phosphodiesterase inhibitors as potential therapeutic agents. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1977; 17:441-477.
112. Sáenz de Tejada I, Anglin G, Knight JR, Emmick JT. Effects of tadalafil on erectile dysfunction in men with diabetes. *Diabetes Care.* 2002 Dec;25(12):2159-64.
113. Behrend L, Vibe-Petersen J, Perrild H. Sildenafil in the treatment of erectile dysfunction in men with diabetes: demand, efficacy and patient satisfaction. *Int J Impot Res.* 2005 May-Jun;17(3):264-9.
114. Goldstein I, Lue TF, Padma-Nathan H, Rosen RC, Steers WD, Wicker PA. Oral sildenafil in the treatment of erectile dysfunction. Sildenafil Study Group. *N Engl J Med.* 1998 May 14;338(20):1397-404
115. Kovanecz I, Rambhatla A, Ferrini MG, Vernet D, Sanchez S, Rajfer J, Gonzalez-Cadavid N. Chronic daily tadalafil prevents the corporal fibrosis and veno-occlusive dysfunction that occurs after cavernosal nerve resection. *BJU Int.* 2008 Jan;101(2):203-10.
116. Filippi S, Morelli A, Sandner P, Fibbi B, Mancina R, Marini M, Gacci M, Vignozzi L, Vannelli GB, Carini M, Forti G, Maggi M. Characterization and functional role of androgen-dependent PDE5 activity in the bladder. *Endocrinology.* 2007 Mar;148(3):1019-29.

117. Sairam K, Kulinskaya E, McNicholas TA, Boustead GB, Hanbury DC. Sildenafil influences lower urinary tract symptoms. *BJU Int.* 2002 Dec;90(9):836-9.
118. Mulhall JP, Guhring P, Parker M, Hopps C. Assessment of the impact of sildenafil citrate on lower urinary tract symptoms in men with erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2006 Jul;3(4):662-7.
119. Chang SH. Influence of sildenafil on lower urinary tract symptoms. *J Urol.* 2006; 175 (suppl): 299 (Abstract).
120. Gacci M, Bartoletti R, Figlioli S, Sarti E, Eisner B, Boddi V, Rizzo M. Urinary symptoms, quality of life and sexual function in patients with benign prostatic hypertrophy before and after prostatectomy: a prospective study. *JU Int.* 2003 Feb;91(3):196-200.
121. Mc Vary KT. Sildenafil improves erectile function and concomitant lower urinary tract symptoms in men. *J Urol.* 2006: 175 (suppl): 298 (Abstract).
122. Mc Vary KT. Sildenafil improves erectile function and urinary symptoms in men with erectile dysfunction and concomitant LUTS. *J Urol.* 2006: 175 (suppl): 527 (Abstract).
123. Roehrborn CG. The efficacy and safety of tadalafil administered once day for lower urinary tract symptoms (LUTS) in men with benign prostatic hyperplasia. *J Urol.* 2006: 175 (suppl): 527 (Abstract).
124. Stacey P, Rulten S, Dapling A, Phillips SC. Molecular cloning and expression of human cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5). *Biochem Biophys Res Commun.* 1998 Jun 18;247(2):249-54.

125. Morelli A, Filippi S, Mancina R, Luconi M, Vignozzi L, Marini M, Orlando C, Vannelli GB, Aversa A, Natali A, Forti G, Giorgi M, Jannini EA, Ledda F, Maggi M. Androgens regulate phosphodiesterase type 5 expression and functional activity in corpora cavernosa. *Endocrinology*. 2004 May;145(5):2253-63.
126. Beavo JA. Cyclic nucleotide phosphodiesterases: functional implications of multiple isoforms. *Physiol Rev*. 1995 Oct;75(4):725-48.
127. Zapol WM, Rimar S, Gillis N, Marletta M, Bosken CH. Nitric oxide and the lung. *Am J Respir Crit Care Med*. 1994 May;149(5):1375-80.
128. Sanchez LS, de la Monte SM, Filippov G, Jones RC, Zapol WM, Bloch KD. Cyclic-GMP-binding, cyclic-GMP-specific phosphodiesterase (PDE5) gene expression is regulated during rat pulmonary development. *Pediatr Res*. 1998 Feb;43(2):163-8
129. Lepore JJ, Maroo A, Pereira NL, Ginns LC, Dec GW, Zapol WM, Bloch KD, Semigran MJ. Effect of sildenafil on the acute pulmonary vasodilator response to inhaled nitric oxide in adults with primary pulmonary hypertension. *Am J Cardiol*. 2002 Sep 15;90(6):677-80.
130. Palmieri EA, Affuso F, Fazio S, Lembo D. Tadalafil in primary pulmonary arterial hypertension. *Ann Intern Med*. 2004 Nov 2;141(9):743-4.
131. Bremer HC, Kreisel W, Roecker K, Dreher M, Koenig D, Kurz-Schmieg AK, Blum HE, Roessle M, Deibert P. Phosphodiesterase 5 inhibitors lower both portal and pulmonary pressure in portopulmonary hypertension: a case report. *J Med Case Reports*. 2007 Jul 10;1:46.
132. Seftel AD, Sun P, Swindle R. The prevalence of hypertension, hyperlipidemia, diabetes mellitus and depression in men with erectile dysfunction. *J Urol*. 2004 Jun;171(6 Pt 1):2341-5.

133. Billups KL, Bank AJ, Padma-Nathan H, Katz S, Williams R. Erectile dysfunction is a marker for cardiovascular disease: results of the minority health institute expert advisory panel. *J Sex Med.* 2005 Jan;2(1):40-50.
134. Conti CR, Pepine CJ, Sweeney M. Efficacy and safety of sildenafil citrate in the treatment of erectile dysfunction in patients with ischemic heart disease. *Am J Cardiol.* 1999 Mar 4;83(5A):29C-34C.
135. Mahmud A, Hennessy M, Feely J. Effect of sildenafil on blood pressure and arterial wave reflection in treated hypertensive men. *J Hum Hypertens.* 2001 Oct;15(10):707-13.
136. Traverse JH, Chen YJ, Du R, Bache RJ. Cyclic nucleotide phosphodiesterase type 5 activity limits blood flow to hypoperfused myocardium during exercise. *Circulation.* 2000 Dec 12;102(24):2997-3002.
137. Herrmann HC, Chang G, Klugherz BD, Mahoney PD. Hemodynamic effects of sildenafil in men with severe coronary artery disease. *N Engl J Med.* 2000 Jun 1;342(22):1622-6.
138. Bocchi EA, Guimarães G, Mocelin A, Bacal F, Bellotti G, Ramires JF. Sildenafil effects on exercise, neurohormonal activation, and erectile dysfunction in congestive heart failure: a double-blind, placebo-controlled, randomized study followed by a prospective treatment for erectile dysfunction. *Circulation.* 2002 Aug 27;106(9):1097-103.
139. Milan DP, Stuart DK. Phosphodiesterase 5 inhibition in chronic heart failure and pulmonary hypertension. *Am J Cardiol.* 2005; 96: 47M-51M.

140. Salloum FN, Ockaili RA, Wittkamp M, Marwaha VR, Kukreja RC. Vardenafil: a novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion injury via opening of mitochondrial K(ATP) channels in rabbits. *J Mol Cell Cardiol.* 2006 Mar;40(3):405-11.
141. Kukreja R, Salloum F, Xi L. Anti-ischemic effects of sildenafil, vardenafil and tadalafil in heart. *Int J Impot Res.* 2007 Mar-Apr;19(2):226-7.
142. Kukreja RC. Cardiovascular protection with sildenafil following chronic inhibition of nitric oxide synthase. *Br J Pharmacol.* 2007 Mar;150(5):538-40.
143. Teixeira CE, Priviero FB, Webb RC. Differential effects of the phosphodiesterase type 5 inhibitors sildenafil, vardenafil, and tadalafil in rat aorta. *J Pharmacol Exp Ther.* 2006 Feb;316(2):654-61.
144. Das A, Smolenski A, Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP-dependent protein kinase Ialpha attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in adult cardiomyocyte. *J Biol Chem.* 2006 Dec 15;281(50):38644-52. Epub 2006 Oct 12.
145. Kukreja RC, Ockaili R, Salloum F, Yin C, Hawkins J, Das A, Xi L. Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition--a novel preconditioning strategy. *J Mol Cell Cardiol.* 2004 Feb;36(2):165-73.
146. Senzaki H, Smith CJ, Juang GJ, Isoda T, Mayer SP, Ohler A, Paolocci N, Tomaselli GF, Hare JM, Kass DA. Cardiac phosphodiesterase 5 (cGMP-specific) modulates beta-adrenergic signaling in vivo and is down-regulated in heart failure. *FASEB J.* 2001 Aug;15(10):1718-26.
147. Corbin J, Rannels S, Neal D, Chang P, Grimes K, Beasley A, Francis S. Sildenafil citrate does not affect cardiac contractility in human or dog heart. *Curr Med Res Opin.* 2003;19(8):747-52.

148. Dunkern TR, Hatzelmann A. The effect of Sildenafil on human platelet secretory function is controlled by a complex interplay between phosphodiesterases 2, 3 and 5. *Cell Signal*. 2005 Mar;17(3):331-9.
149. Araújo PV, Clemente CM, da Graça JR, Rola FH, de Oliveira RB, dos Santos AA, Magalhães PJ. Inhibitory effect of sildenafil on rat duodenal contractility in vitro: putative cGMP involvement. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2005 Mar;32(3):191-5.
150. Zhang X, Tack J, Janssens J, Sifrim DA. Effect of sildenafil, a phosphodiesterase-5 inhibitor, on oesophageal peristalsis and lower oesophageal sphincter function in cats. *Neurogastroenterol Motil*. 2001 Aug;13(4):325-31.
151. Sarnelli G, Sifrim D, Janssens J, Tack J. Influence of sildenafil on gastric sensorimotor function in humans. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004 Nov;287(5):G988-92.
152. Rastogi S, Rodriguez JJ, Kapur V, Schwarz ER. Why do patients with heart failure suffer from erectile dysfunction? A critical review and suggestions on how to approach this problem. *Int J Impot Res*. 2005 Dec;17 Suppl 1:S25-36.
153. Ahn GJ, Yu JY, Choi SM, Kang KK, Ahn BO, Kwon JW, Kang SK, Lee BC, Hwang WS. Chronic administration of phosphodiesterase 5 inhibitor improves erectile and endothelial function in a rat model of diabetes. *Int J Androl*. 2005 Oct;28(5):260-6.
154. Gori T, Sicuro S, Dragoni S, Donati G, Forconi S, Parker JD. Sildenafil prevents endothelial dysfunction induced by ischemia and reperfusion via opening of adenosine triphosphate-sensitive potassium channels: a human in vivo study. *Circulation*. 2005 Feb 15;111(6):742-6. Epub 2005 Feb 7.

155. Rosano GM, Aversa A, Vitale C, Fabbri A, Fini M, Spera G. Chronic treatment with tadalafil improves endothelial function in men with increased cardiovascular risk. *Eur Urol.* 2005 Feb;47(2):214-20
156. Dishy V, Harris PA, Pierce R, Prasad HC, Sofowora G, Bonar HL, Wood AJ, Stein CM. Sildenafil does not improve nitric oxide-mediated endothelium-dependent vascular responses in smokers. *Br J Clin Pharmacol.* 2004 Feb;57(2):209-12.
157. Vlachopoulos C, Tsekoura D, Alexopoulos N, Panagiotakos D, Aznaouridis K, Stefanadis C. Type 5 phosphodiesterase inhibition by sildenafil abrogates acute smoking-induced endothelial dysfunction. *Am J Hypertens.* 2004 Nov;17(11 Pt 1):1040-4.
158. Ludmer PL, Selwyn AP, Shook TL, Wayne RR, Mudge GH, Alexander RW, Ganz P. Paradoxical vasoconstriction induced by acetylcholine in atherosclerotic coronary arteries. *N Engl J Med.* 1986 Oct 23;315(17):1046-51.
159. Bossaller C, Habib GB, Yamamoto H, Williams C, Wells S, Henry PD. Impaired muscarinic endothelium-dependent relaxation and cyclic guanosine 5'-monophosphate formation in atherosclerotic human coronary artery and rabbit aorta. *J Clin Invest.* 1987 Jan;79(1):170-4.
160. Chester AH, O'Neil GS, Moncada S, Tadjkarimi S, Yacoub MH. Low basal and stimulated release of nitric oxide in atherosclerotic epicardial coronary arteries. *Lancet.* 1990 Oct 13;336(8720):897-900.
161. Nabel EG, Selwyn AP, Ganz P. Large coronary arteries in humans are responsive to changing blood flow: an endothelium-dependent mechanism that fails in patients with atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 1990 Aug;16(2):349-56.

162. Gresser U, Gleiter CH. Erectile dysfunction: comparison of efficacy and side effects of the PDE-5 inhibitors sildenafil, vardenafil and tadalafil--review of the literature. *Eur J Med Res.* 2002 Oct 29;7(10):435-46.
163. Ballard SA, Gingell CJ, Tang K, Turner LA, Price ME, Naylor AM. Effects of sildenafil on the relaxation of human corpus cavernosum tissue in vitro and on the activities of cyclic nucleotide phosphodiesterase isozymes. *J Urol.* 1998 Jun;159(6):2164-71.
164. Laties A, Sharlip I. Ocular safety in patients using sildenafil citrate therapy for erectile dysfunction. *J Sex Med.* 2006 Jan;3(1):12-27.
165. Cunningham AV, Smith KH. Anterior ischemic optic neuropathy associated with viagra. *J Neuroophthalmol.* 2001 Mar;21(1):22-5.
166. Donahue SP, Taylor RJ. Pupil-sparing third nerve palsy associated with sildenafil citrate (Viagra). *Am J Ophthalmol.* 1998 Sep;126(3):476-7.
167. Gorkin L, Hvidsten K, Sobel RE, Siegel R. Sildenafil citrate use and the incidence of nonarteritic anterior ischemic optic neuropathy. *Int J Clin Pract.* 2006 Apr;60(4):500-3.
168. Giordano D, De Stefano ME, Citro G, Modica A, Giorgi M. Expression of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterase (PDE5) in mouse tissues and cell lines using an antibody against the enzyme amino-terminal domain. *Biochim Biophys Acta.* 2001 May 28;1539(1-2):16-27.
169. Kruuse C, Rybalkin SD, Khurana TS, Jansen-Olesen I, Olesen J, Edvinsson L. The role of cGMP hydrolysing phosphodiesterases 1 and 5 in cerebral artery dilatation. *Eur J Pharmacol.* 2001 May 18;420(1):55-65

170. Arnavaz A, Aurich A, Weissenborn K, Hartmann U, Emrich HM, Schneider U. Effect of sildenafil (Viagra) on cerebral blood flow velocity: a pilot study. *Psychiatry Res.* 2003 Apr 1;122(3):207-9.
171. Oh M, Chang H, Minn KW. The effects of tadalafil on axial-pattern skin flap survival in rats. *Dermatol Surg.* 2008 May;34(5):626-30; discussion 630. Epub 2008 Feb 6.