

T. C.

NECMETTİN ERBAKAN ÜNİVERSİTESİ

MERAM TIP FAKÜLTESİ

KALP VE DAMAR CERRAHİSİ ANABİLİM DALI

Prof. Dr. Ali SARIGÜL

EPİDURAL ANESTEZİNİN AKUT
ALT EKSTREMİTE İSKEMİ REPERFÜZYON HASARINA ETKİLERİ
(DENEYSEL ÇALIŞMA)

Dr. Gürhan HACİBEYOĞLU

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanı

Prof. Dr. Erdal EGE

KONYA

2012

İÇİNDEKİLER

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	2
2.1. Akut alt ekstremite iskemisi.....	2
2.2. İskemi reperfüzyon hasarı.....	5
2.2.1. İskemi reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi.....	6
2.2.2. Serbest oksijen radikalleri.....	8
2.2.3. İskemi reperfüzyon hasarında lokositlerin rolü	10
2.2.4. İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü.....	12
2.2.5. Çalışmada kullanılan iskemi reperfüzyon hasarının belirteçleri.....	12
2.2.5.1. Süperoksit dismutaz.....	12
2.2.5.2. Malondialdehit.....	13
2.2.5.3. Interlökin-6	13
2.2.5.4. TNF – α	13
2.2.5.5. ICAM-1.....	14
2.3. Epidural anestezi.....	15
2.3.1. Tavşanların epidural anatomisi.....	17
2.3.2. Epidural anestezinin alt ekstremite dolaşımı üzerine etkileri.....	18
2.3.3. Lidokain.....	19
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	21
3.1. Denekler.....	21

3.2.	İlaçlar.....	21
3.3.	Anestezi.....	21
3.4.	Cerrahi prosedür.....	22
3.4.1.	Epidural kateter yerleştirilmesi.....	23
3.4.2.	Ana femoral arter eksplorasyonu.....	24
3.5.	Deney grupları.....	25
3.6.	Kan ve doku örneklerinin alınması.....	26
3.7.	İskemi reperfüzyon hasarı belirteçlerinin ölçümü.....	27
3.7.1.	IL-6 düzeyi ölçümü.....	27
3.7.2.	TNF- α ölçümü.....	27
3.7.3.	SOD aktivitesi ölçümü.....	27
3.7.4.	MDA düzeyi ölçümü.....	28
3.8.	İmmunhistokimyasal inceleme.....	28
3.9.	İstatistiksel yöntem.....	29
4.	BULGULAR.....	30
4.1.	Biyokimyasal Bulgular.....	30
4.2.	Histopatolojik Bulgular.....	31
4.2.1.	Hematoksilen Eosin ile Değerlendirme.....	31
4.2.2.	İmmunhistokimyasal Değerlendirme.....	32
5.	TARTIŞMA ve SONUÇ.....	37
6.	ÖZET.....	42

7. ABSTRACT.....	44
8. KAYNAKLAR.....	46
9. TEŞEKKÜR.....	53

KISALTMALAR

APTT Aktif parsiyel tromboplastin zamanı

ATP Adenozin trifosfat

Ca Kalsiyum

CAT Katalaz

Cu Bakır

DAB Diaminobenzidine

Fe Demir

GPX Glutasyon peroksidaz

H₂O₂ Hidrojen peroksit

HE Hematoksilen eosin

ICAM İntersellüler adezyon molekülü

IL İnterkökin

IR İskemi reperfüzyon

MCP Monosit kemotaktik protein

MDA Malondialdehit

MIP Makrofaj inflamatuvar protein

Mn Mangan

MODS Multi organ yetmezlik sendromu

MPO Myeloperoksidaz

NAD Nikotinamid adenin dinükleotid

O₂⁻ Süperoksit radikali

OH⁻ Hidroksil radikali

PECAM Platelet endotelyal hücre adezyon molekülü

PBS Fosfat buffer saline

PMNL Polimorfonükleer lokosit

SIRS Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu

SOD Süperoksit dismutaz

SOR Serbest oksijen radikalleri

TNF Tümör nekrotizan faktör

VCAM Vasküler hücre adezyon molekülü

Zn Çinko

TABLO DİZİNİ

Tablo 1. Akut alt ekstremite iskemisinin klinik sınıflaması.

Tablo 2. Biyokimyasal verilerin sonuçları.

Tablo 3. Grupların immunohistokimyasal skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi.

ŞEKİL DİZİNİ

Şekil 1. İskemi reperfüzyon hasarında ksantin dehidrogenaz/oksidaz enzimleri ve süperoksit üretimi.

Şekil 2. Lokosit rolling, adezyon ve diapedezi.

Şekil 3. Epidural kateter yerleştirilmesi.

Şekil 4. Kaudal epidural blok.

Şekil 5. Lidokainin kimyasal yapısı.

RESİM DİZİNİ

Resim 1. Yerleştirilmiş sol karotis arter ve trakeostomi kanülü.

Resim 2. Kaudal yöntemle girilerek yerleştirilmiş epidural kateter.

Resim 3. Kemik yapılar uzaklaştırıldıktan sonra epidural kateterin yerinin doğrulanması.

Resim 4. Ana femoral arterin klemplenmesi.

Resim 5. IR grubu, PMN lokositlerin diapedesi (HE X40)

Resim 6. Femoral arter endoteli; kontrol grubu , ICAM-1 immunreaktivitesi gözlenmedi.
DABX20

Resim 7. Gastroknemius kası; kontrol grubu , ICAM-1 immunreaktivitesi gözlenmedi. DAB
X20

Resim 8. Femoral arter endoteli, IR grubu, şiddetli (+++) ICAM-1 immunreaktivitesi.
DABX20

Resim 9. Gastrocnemius kası, IR grubu, şiddetli (+++) ICAM-1 immunreaktivitesi. DABX20

Resim 10. Femoral arter endoteli, IR+ epidural anestezi grubu, hafif şiddette (+) ICAM -1
immunreaktivitesi. DABX40

Resim 11. Gastroknemius kas dokusu, IR + epidural anestezi grubu, hafif şiddette (+)
ICAM -1 immunreaktivitesi. DABX20

1. GİRİŞ

Akut alt ekstremitte iskemisi çoğunlukla, altta yatan aterosklerotik periferik arter hastalığına bağlı arteriyel tromboz, kardiyak orijinli veya proksimal arteriyel anevrizmadan kaynaklanan arteriyel emboliye bağlı olarak gelişir (1). İlerleyen yaşla birlikte görülme sıklığı artar. Gerçek insidansı çok iyi bilinmese de tahmini epidemiyolojik verilere göre 100.000'de 14 kişide görülür ve bu insidans vasküler cerrahinin %10-16'sından sorumludur (6). Sıklıkla alt ekstremitte gelişen akut ekstremitte iskemisinde cerrahi serilerde belirtilen amputasyon ve ölüm oranı sırasıyla %7 ve %10'dur (2).

Akut alt ekstremitte iskemisinin başlaması ile birlikte aerobik metabolizma anaerobik metabolizma yönüne kayar ve laktat üretimi artar. İskemik hasar endotelial bütünlüğün kaybolmasına interstisyel ödeme ve bacakta gerginlikle birlikte nekroza yol açar. Sistemik olarak bu durum inflamatuvar mediatörlerin salınımına (IL-1, 6, 8, TNF - α ve MCP-1) ve kompleman kaskadının aktivasyonuna neden olur. Multiorgan disfonksiyonu, akut akciğer hasarı, akut böbrek yetmezliği ve miyokardiyal disfonksiyon görülebilir ve bu olaylar zinciri yaşamı tehdit edebilir (1).

Günümüzde sıklıkla kullanılan epidural anestezinin, alt ekstremitte dolaşımı üzerine olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Epidural anestezinin femorodistal rekonstrüksiyon yapılan hastalarda periferik vasküler rezistansı azaltarak greft içi kan akımını artırdığı (49), infrainguinal bypass yapılan hastalarda arteriyel inflowu artırarak ve venöz boşalmayı sağlayarak postoperatif alt ekstremitte kan akımını artırdığı (48), aortofemoral cerrahi sonrası lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (50). Bu veriler akut alt ekstremitte iskemisi ile başvuran hastalarda, postoperatif dönemde de devam eden epidural anestezi uygulamasının faydalı olacağını düşündürmektedir.

Çalışmamızda, epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına etkilerini tavşan modelinde araştırmak amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. AKUT ALT EKSTREMİTE İSKEMİSİ

Akut alt ekstremitte iskemisi 14 günden daha az sürede başlayan alt ekstremitte perfüzyonunda azalma ile seyreden ve ekstremitte kaybı ve ölüm riskine neden olabilen durum olarak tanımlanmaktadır (1). Çoğunlukla altta yatan aterosklerotik periferik arter hastalığına bağlı arteriyel tromboz, kardiyak orijinli veya proksimal arteriyel anevrizmadan kaynaklanan arteriyel emboliye bağlı olarak gelişir. Diğer etiyojiler arasında hava, yağ ve amniotik sıvı embolisi, tümör ve travmaya bağlı emboli mevcuttur. Altta yatan periferik ateroskleroz bulunmayan hastalarda, artere dışarıdan bası, arteriyel diseksiyon veya altta yatan hiperkoagülabilitte durumu arteriyel tromboza ve akut alt ekstremitte iskemisine neden olabilir (1,2). Arteriyel embolilerin %80'inde kardiyak kaynak söz konusudur (3). İntrakardiyak pıhtı gelişmesinde en büyük riski miyokard infarktüsü, mitral stenozlu ve atrial fibrilasyonlu hastalar taşır (4). Arteriyel emboliler için diğer bir kaynaktan kalp kapağı protezleridir. Kapağın üzerinde veya dikiş yerlerinde trombüs oluşumu görülebilir (5). Gerçek insidansı çok iyi bilinmese de tahmini epidemiyolojik verilere göre 100.000 de 14 kişide görülür ve bu insidans vasküler cerrahinin %10-16' sından sorumludur. İlerleyen yaşla birlikte görülme sıklığı artar (6). Femoro-popliteal bölge, tromboembolilerin en sık gözlenen yerleşim yeridir (7). Sıklıkla alt ekstremitte gelişen akut ekstremitte iskemisinde cerrahi serilerde belirtilen amputasyon ve ölüm oranı sırasıyla %7 ve %10'dur. Genellikle mortalite; altta yatan kardiyak hastalık nedeniyle, embolizasyona bağlı akut alt ekstremitte iskemisi gelişen hastalarda tromboza bağlı olarak gelişenlere göre daha yüksektir (2).

Akut alt ekstremitte iskemisinin başlaması ile birlikte aerobik metabolizma anaerobik metabolizma yönüne kayar ve laktat üretimi artar. İskemik hasar endotelial bütünlüğün kaybolmasına interstisyel ödeme ve bacakta gerginlikle birlikte nekroza yol açar. Sistemik olarak bu durum inflamatuvar mediatörlerin salınımına (IL-1, 6, 8, TNF – α ve MCP-1) ve kompleman kaskadının aktivasyonuna neden olur. Multiorgan disfonksiyonu, akut akciğer hasarı, akut böbrek yetmezliği ve miyokardiyal disfonksiyon görülebilir ve bu olaylar zinciri yaşamı tehdit edebilir. Akut alt ekstremitte iskemisinin klinik prezentasyonu lokalizasyona, süreye, kollateral sirkülasyonun derecesine, önceden periferik arter

hastalığının varlığına (önceden varolan kollaterallere) ve doku iskemisinin metabolik sonuçlarına bağlıdır. Etiolojisinde emboli bulunan hastaların semptomları tipik olarak ani başlar. Buna karşın altta yatan periferik arter hastalığı bulunan arteriyel trombozlu olgularda semptomlar yavaş yavaş gelişir. Bu hastalarda kollateral sirkülasyon gelişerek, perfüzyon için alternatif yollar sağlanır ve iskeminin klinik şiddeti azaltılır (1).

Rutherford ve ark. tarafından 1997 yılında akut alt ekstremitte iskemisinin klinik sınıflaması yapılmıştır (Tablo 1) (8).

KATEGORİ	TANIM/PROGNOZ	BULGULAR		DOPPLER SİNYALİ	
		HİS KAYBI	KAS GÜÇSÜZLÜĞÜ	ARTERİYEL	VENÖZ
I.Canlı	Acil risk yok	Yok	Yok	Alınabilir	Alınabilir
II.Riskli					
a.Sınırdadır	Zamanında müdahale ile kurtarılabilir	Minimal(ayak parmaklarında) veya yok	Yok	Alınamaz	Alınabilir
b.Acil	Acil revaskülarizasyon ile kurtarılabilir	Ayak parmaklarında istirahat ağrısı	İlımlı,orta	Alınamaz	Alınabilir
III.Geri dönüşümsüz	Majör doku kaybı veya kaçınılmaz kalıcı sinir hasarı	Şiddetli; hissizlik	Şiddetli,paralizi(rigor)	Alınamaz	Alınamaz

Tablo 1. Akut alt ekstremitte iskemisinin klinik sınıflaması (8).

Rutherford Sınıf I ve IIa ile başvuran hastalarda endovasküler revaskülarizasyon uygun başlangıç stratejisi olup, 30 günlük ekstremitte kurtarılma oranı %84 ile 95 arasında bildirilmiştir. Rutherford Sınıf IIb ile başvuran hastalarda ekstremitenin kurtarılması için 3-6 saat içinde revaskülarizasyon gereklidir. İrreversible akut alt ekstremitte iskemisi ile başvuran hastalarda revaskülarizasyon uygun değildir. Çünkü yaygın kas nekrozu ve ekstremitenin canlılığını kaybetmiş olması nedeniyle revaskülarizasyon, reperfüzyon sendromunu hızlandırabilir. Reperfüzyon sendromu sistemik inflamatuvar mediatörlerin salınımı ile karakterizedir ve multiorgan hasarı ve ölüme neden olabilir. Bu nedenle Rutherford Sınıf III akut alt ekstremitte iskemisinde primer amputasyon uygundur ve revaskülarizasyon kontrendikedir. Bu noktada amputasyon seviyesinin distale çekilmesi için ve amputasyon sonrası ekstremitte iyileşmesi için endovasküler revaskülarizasyonun rolü olabilir.

Kontrendike olmadıkça hastalara en kısa sürede 325 mg aspirin verilmelidir. Trombüsün artmasını önlemek için intravenöz anfraksiyone heparin ile hastaya terapötik dozda antikoagülasyon başlanmalıdır (APTT nin 2-2.5 katı olacak şekilde). Diğer bir öneriye

göre diagnostik anjiogram hemen yapılabilecek ise, heparinizasyonun kardiyak kateter laboratuvarında arteriyel giriş yolu elde edilene kadar geciktirilmesi kabul edilebilir bir seçenektir. Akut alt ekstremitte iskemisi ile başvuran hastalarda statin veya klopidogrel tedavisi ile ilgili bir veri yoktur.

Noninvaziv yöntemler olan manyetik rezonans ve bilgisayarlı tomografinin vasküler anatomiye belirlemede rolü var olsa da, bu rolleri sınırlıdır. Eğer noninvaziv bir teknik seçilecekse bunun terapötik müdahaleyi geciktirmeyeceğinden emin olunmalıdır. Acil diagnostik anjiografi iskeminin derecesi hakkında objektif bir değerlendirme sağlar, etiyoloji hakkında fikir verir ve tedavi stratejisini belirlemede yol gösterir (1).

Önceki cerrahi stratejiler fogarty balonu ile kateter embolektomi ve patchlasti iken, yeni cerrahi stratejiler yeni bypass greft yerleştirilmesi ve endarterektomiye içerir. Açık cerrahi teknikle mortalite oranı yüksektir (%20-25). Endovasküler ve kateter temelli yaklaşımlar intraarteriyel trombolitik tedavi, mekanik trombektomi cihazları ve stentle birlikte veya stentsiz balon anjioplastiyi içerir (1).

Arteriyel akım cerrahi revaskülarizasyonla veya farmakolojik olarak trombüsün çözünmesi ile sağlanabilir. Kritik iskemik bacakta acil cerrahi revaskülarizasyon endikedir. Kateter embolektomi aterosklerotik olmayan alt ekstremitte iskemisinde genellikle tercih edilir. Kateter ile direkt intraarteriyel trombolitik tedavi akut alt ekstremitte iskemisinde yaygın olarak kullanılan bir yöntem haline gelmiştir. Bu yöntem nativ arter veya bypass greftlerin akut oklüzyonunda majör cerrahi tedaviye gerek kalmaksızın kesin tedavi sağlayabilir. Şu hastalar intraarteriyel trombolitik tedavi için adaydır:

- a) 14 günden kısa süreli daha önce patent olan bypass greft veya nativ arter trombüsü,
- b) Embolektomi ile ulaşılabilir olmayan trombüs,
- c) Tüm run-off damarların tromboze olduğu popliteal arter anevrizmasına bağlı trombüs,
- d) Cerrahinin yüksek mortalite riski taşıdığı akut tromboembolik durumlar.

Yapılan çalışmalar, acil cerrahi gerektirmeyen ve irreversibl olmayan bacak iskemisinde trombolitik tedavinin uygun bir başlangıç tedavisi olabileceğini

düşündürmektedir. Bu yaklaşımın kullanılmasıyla, altta yatan lezyon anjiyografi ile daha ayrıntılı tanımlanabilir ve perkutan veya cerrahi revaskülarizasyon prosedürleri uygulanabilir. Bununla birlikte intraarteriyel trombolitik tedavide şiddetli kanama hala nadir olmayan bir komplikasyondur ve intrakraniyal kanama riski % 1-2 dir (6).

2.2. İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI

İskemi, başka deyişle dokuya gelen kan miktarının azalması, klinik tıpta en sık görülen hücre zedelenmesi nedenidir. Anaerobik glikoliz ile enerji üretiminin devam edebildiği hipoksinin aksine; iskemide glikoliz için gerekli maddelerin ortama getirilmesinde de sorun vardır. Bu yüzden iskemik dokularda potansiyel substratlar tükendiğinde veya normalde kan akımı ile uzaklaştırılacak metabolitler glikolizi inhibe ettiğinde anaerobik enerji üretimi de durur. Dolayısıyla iskemi dokuları hipoksiden daha hızlı zedeler. Hipoksik hücrelerde hücre zedelenmesine neden olan asıl biyokimyasal anormallik, azalan oksijen nedeniyle hücre içinde ATP üretiminin düşmesidir. ATP kaybı iyon pompalarının yetmezliğine (hücre şişmesine ve hücre içi Ca^{2+} girişine), glikojen depolarının boşalmasına, laktik asit birikimi ve hücre içi pH azalmasına, protein sentezinin azalmasına ve çok sayıda enerjiye bağımlı hücre sisteminin yetmezliğine neden olur. Yeniden oksijen sağlanırsa tüm bu değişiklikler geri dönüşlüdür. İskemi devam ederse geri dönüşsüz zedelenme ile nekroz meydana gelir. Geri dönüşsüz zedelenmede mitokondrilerin ileri derecede şiştiği, lizozomların şiştiği, plazma membranında ağır hasar görülür (9).

Hücreler geri dönüşlü zedelenmişlerse; kan akımının yeniden sağlanması, hücrenin iyileşmesi ile sonuçlanabilir. Ancak, belli bazı durumlarda, iskemik fakat canlı olan dokuda kan akımının yeniden sağlanması, paradoksal olarak zedelenmenin artması ve hızlanması ile sonuçlanır (9).

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak gerekli olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Birçok çalışmada, reperfüzyon hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (10).

IR hasarı sırasında lökosit, endotel, T lenfosit, monosit ve platelet aktivasyon ve hücreler arası etkileşimleri gerçekleşmekte olup, hasarın genişlemesinde lökosit- endotel ve lökosit-platelet etkileşimleri merkezi rol oynar (11).

İskelet kası alt ekstremitede iskemiye en savunmasız dokudur. Kas dokusu ekstremitenin kültüsel olarak en fazla bulunan ve iskemiye en duyarlı dokusu olması nedeniyle alt ekstremitenin reperfüzyon sendromunda en kritik dokudur. İskelet kas hasarının iskeminin şiddeti ve süresi ile orantılı olduğu aşikardır. Fizyolojik ve anatomik çalışmalar göstermiştir ki kas hücresinde irreversibl hasar 3. Saatte başlar ve 6. Saatte neredeyse tamamlanır (12).

Kaslar içerdikleri miyoglobin miktarına göre kırmızı (tip 1) ve beyaz (tip 2) kaslar olmak üzere iki gruba ayrılırlar. Pek çok kas, her iki tip kas lifini de benzer oranlarda içermekteyken, bacağın ön kompartmanındaki kaslarda daha çok kırmızı-yavaş seyiren tip 1 lifler, gastrokinemius kasında ise beyaz-hızlı seyiren tip 2 lifler baskındır. Kırmızı-yavaş seyiren liflerde ana enerji kaynağı trigliseritlerin oksidatif metabolizmasıyken, beyaz-hızlı seyiren liflerde glikojenin anaerobik yoldan metabolize edilmesidir. Bu durum kırmızı-yavaş seyiren liflerin iskemiye olan duyarlılığını arttır (13).

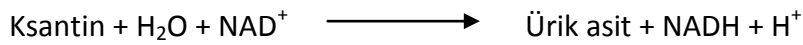
Alt ekstremitte IR hasarında, lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler baslıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir (12). Reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar araçlar, uzak organ endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona neden olurlar. IR' a bağlı uzak organ hasarında, ksantin oksidaz, lökosit-endotel etkilesimi ve inflamatuvar araçlar önemli rol oynar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden multiple organ yetmezlik sendromu (MODS) veya sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişebilir (14).

2.2.1. İskemi Reperfüzyon Hasarının Fiziopatolojisi

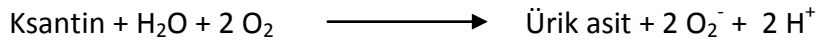
İskemik dönemde hücrede metabolik ve yapısal değişiklikler meydana gelir. Dokuya gelen kan akımının kesilmesi ile hücresel oksidatif fosforilasyon azalır, ATP ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Hücrede enerji depolarının boşalması ile hücre zarında bulunan Na⁺ K⁺ ATP az pompası inhibe olur. Sonuçta hücre içinde Na⁺ ve

Ca²⁺ iyon konsantrasyonları artar. Hücre içinde Ca²⁺ iyon konsantrasyonunun artışı hücre için sitotoksiktir. Nitekim yine bu dönemde hücrede iyon konsantrasyonunun değişimi ile proinflamatuvar sitokinlerin lökosit adhezyon moleküllerinin yapımında artış, buna karşılık antioksidan enzimlerin oluşumunda azalma olur. Bu durum hücreyi reperfüzyon dönemindeki hasara karşı dayanıksız kılar (15).

İskemi reperfüzyon gelişen dokularda ksantin dehidrogenaz/oksidaz enzimi serbest oksijen radikallerinin potansiyel kaynağıdır. Sağlıklı dokularda %90 oranında ksantin dehidrogenaz (tip D) sentezlenir. Bu enzim formu ksantin oksidasyonu sırasında elektron alıcısı olarak NAD⁺ kullanır ve aşağıdaki reaksiyonu gerçekleştirir:

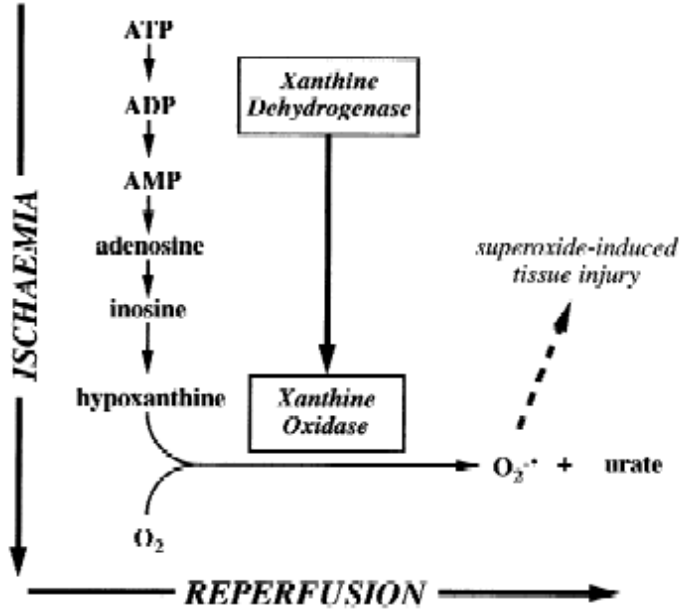


Alternatif olarak ksantin oksidaz (tip O) enzimi elektron alıcısı olarak moleküler oksijeni kullanır ve süperoksid radikali üretir:



Doku iskemisi sonucunda ksantin dehidrogenaz formu ksantin oksidaz formuna dönüşmektedir. Bu dönüşüm ATP kaybı ve membran kalsiyum gradientinin kaybı nedeniyle gelişmektedir. Sitozolik kalsiyum konsantrasyonunun artması ile kalsiyum bağımlı proteaz ksantin dehidrogenazı ksantin oksidaza dönüştürür. Oksidatif fosforilasyonun durması ve ATP re-sentezinin durması ile AMP, adozin, inosin ve hipoksantin meydana gelir. Reperfüzyonun başlaması ile substrat olarak kullanılan moleküler oksijenin tekrar ortamda bulunması üzerine hızlı bir şekilde süperoksid radikali oluşur (16). (Şekil 1).

IR hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunlar birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir. Özellikle; serbest oksijen radikalleri, polimorf nüveli lökositler (PMNL) , kompleman sistemi, endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır (15).



Şekil 1. İskemi reperfüzyon hasarında Ksantin dehidrogenaz/oksidaz enzimleri ve süperoksit üretimi (16).

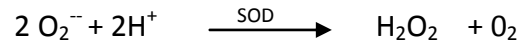
2.2.2. Serbest Oksijen Radikalleri

İlk kez 1954 yılında, oksijenin biyolojik sistemlerde görülen toksik etkilerinin oksijenin bazı reaktif türlerinden kaynaklanabileceği ileri sürülmüştür. Bugün oksijenin canlılardaki toksik etkilerinin oksijen radikalleri olarak adlandırılan ve oksijenin vücuttaki metabolizması sırasında oluşan reaktif türlerden kaynaklandığı bilinmektedir. Radikaller dış orbitallerinde paylaşılmamış elektron içeren kimyasal türlerdir. Böylece bir kimyasal tür basit bir atom ya da kompleks yapıya organik bir molekül olabilir. Vücudumuzda oluşabilen radikallerin sayısı yüzlerce farklı tür şeklinde ifade edilebilirse de bu radikaller arasında süperoksit, H₂O₂, nitrik oksit ve hidroksil radikalının özel yerleri vardır. Hatta bu radikaller içinde süperoksit ve nitrik oksit temel radikaller sayılabilir. Çünkü süperoksit ve nitrik oksit enzimatik mekanizmalarla, devamlı olarak ve önemli derişimde üretilen radikallerdir. Ayrıca bu iki radikal, biyolojik sistemlerde tanıdığımız diğer bütün önemli radikaller ile radikal yapıda olmayan reaktif türlerin oluşumunu başlatabilecek özelliktedirler (17).

Serbest oksijen radikalleri hücre ve organellerin membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarı yoluyla hücrede hasara neden olur. Reperfüzyon; iskemi tarafından oluşturulan hasarı, O₂⁻, OH⁻ ve H₂O₂ aracılığıyla daha da artırır ve bu hasar genellikle iskemik hasardan daha yıkıcıdır (14).

Aerobik canlılarda serbest radikaller için en önemli kaynağın moleküler oksijen olduğu kabul edilmektedir. Normal metabolizma sırasında oksijenin %98'i H₂O'ya indirgenmektedir. Geriye kalan %2'lik kısım süperoksit ve hidroksil radikaline dönüşür. En önemli serbest oksijen radikalleri süperoksit (O₂⁻) ve hidroksil (OH⁻) anyonlarıdır (18).

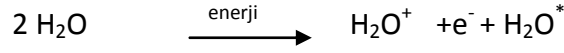
Süperoksit radikali (O₂⁻) , canlılarda ilk olduğu gösterilen radikaldir. İndirgeyici özellikteki birçok biyomolekülün aerobik ortamda oksitlenmesi sonucu, başlıca çeşitli dehidrogenazlar ve oksidazlar olmak üzere yüzlerce enzimin katalitik etkisi sırasında, mitokondrideki enerji metabolizması sırasında elektron kaçağı ile ve aktive fagositik lokositlerde üretilir. Hücrel koşullarda üretilen O₂⁻ , oksitleyici veya indirgeyici gibi davranabilir. Aldığı elektronu metal iyonuna sitokrom c'ye veya bir radikale verirse tekrar tekrar oksijene oksitlenir. Aerobik canlılarda süperoksitlerin H₂O₂' ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir ve bu reaksiyon 'dismutasyon tepkimesi' olarak adlandırılır (17).



Hidrojen peroksit (H₂O₂); oksijenin enzimatik olarak iki elektronla indirgenmesi veya süperoksitlerin enzimatik/nonenzimatik dismutasyonu sonucu oluşur. Yapısında paylaşılmamış elektron içermediğinden radikal özelliği taşımaz, reaktif bir tür değildir. H₂O₂' nin oksitleyici bir tür olarak bilinmesinin nedeni Cu, Fe gibi metal iyonları varlığında hidroksil radikalinin öncüsü olarak davranmasıdır. H₂O₂ özellikle proteinlerdeki hem grubunda bulunan demir ile tepkimeye girerek yüksek oksidasyon düzeyindeki ferril ve perferril demir oluşumuna neden olur. Bu formdaki reaktif demir çok güçlü oksitleyici özelliklere sahip olup hücre zarlarında lipid peroksidasyonunu gibi radikal tepkimeleri başlatabilir. Belirtilen potansiyel oksitleyici özelliği nedeniyle biyolojik sistemlerde oluşan H₂O₂'nin derhal uzaklaştırılması gerekir. Bu görevi hücrelerdeki önemli antioksidan enzimler olan katalaz ve peroksidaz enzimleri yerine getirir (17).

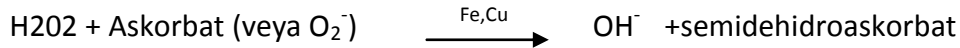
Hidroksil radikali(OH⁻); canlılarda iki mekanizma ile oluşabilir:

a . İyonlaştırıcı radyasyonun etkisiyle sulu ortamda su moleküllerinin iyonlaşması ile



Uyarılmış su molekülü (H_2O^*) homolitik yıkım ile; H_2O^+ ise bir su molekülü ile tepkimeye girerek başlıca reaktif radikal olarak hidroksil radikallerini oluştururlar. Bu tepkimeler femtosaniye içinde gerçekleşir ve üretilen OH^- , radyasyonun canlılardaki toksik etkisinden sorumlu başlıca kimyasal türdür.

b. H_2O_2 'nin eksik indirgenmesi ile OH^- yapımı, vücutta bu radikalın en önemli kaynağıdır. H_2O_2 'nin iki elektron ile indirgenmesi ile su oluşurken, tek elektronla indirgenmesi OH^- yapımına neden olur. Bu tür indirgenme Fe, Cu gibi metal iyonları tarafından katalizlenir. Askorbik asit, süperoksit gibi indirgeyici bileşiklerin de bulunduğu ortamda, oksitlenen metal iyonu tekrar indirgendiğinden, H_2O_2 'den OH^- yapımı sürekli bir duruma gelir:

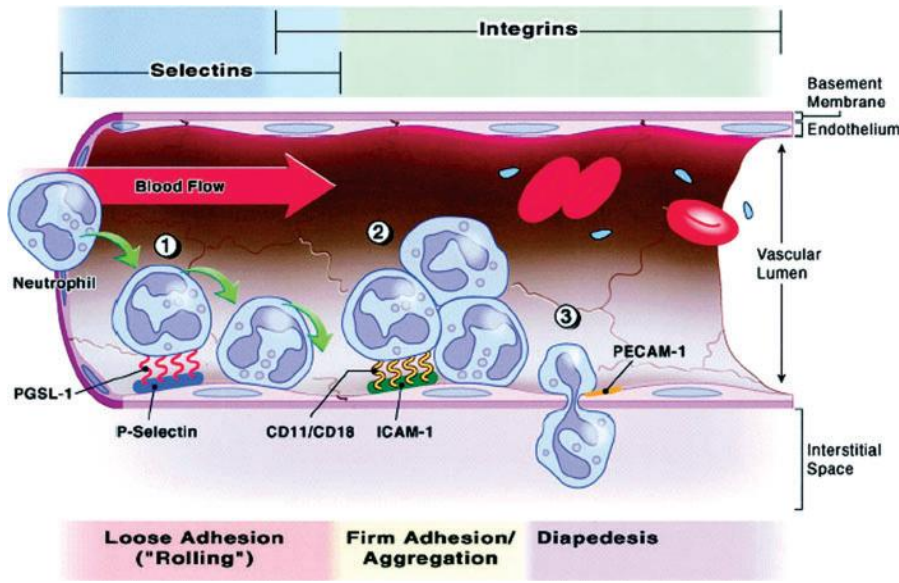


Haber-Weiss tepkimesi ya da Fenton tepkimesi olarak adlandırılan bu tepkime ile ne kadar OH^- oluşacağı vücutta üretilen H_2O_2 derişimi ve serbest metal iyonunun varlığına bağlıdır. Süperoksit hem H_2O_2 'nin öncülü hem de metalleri indirgeyici bir tür olduğundan; süperoksit proteinlere bağlı metallerin indirgenip serbest kalmasına da neden olabildiğinden, biyolojik koşullarda süperoksit yapımının arttığı ortamda OH^- üretimi kaçınılmazdır (17). OH^- son derece reaktif bir oksidan radikal olup yarılanma ömrü çok kısadır. OH^- bilinen en güçlü serbest oksijen radikalidir (19).

2.2.3. İskemi reperfüzyon hasarında lokositlerin rolü

İskemi reperfüzyon hasarı lokosit aktivasyonu, kemotaksis, lokosit-endotel hücre adezyonu ve transmigrasyon ile karakterizedir. Lokosit endotel hücresi arasındaki etkileşim basamakları, rolling, adezyon ve transmigrasyon şeklinde gerçekleşir. İlk basamak IR hasarının, endotelial P-selektin (CD62P) yüzey ekspresyonunu indüklemesi ile başlar. P-selektin, lokositlerdeki karşı reseptör olan PSGL1 (P selektin glikoprotein 1) ile etkileşir. Bu düşük affiniteli etkileşim sonucunda, lokositler ile endotelial hücreler arasında aralıklı bağlanma veya yuvarlanma meydana gelir. Lokosit adezyonu, lokosit β integrinleri olan CD11a/CD18 ve CD11b/CD18'in ICAM-1 ile etkileşimi sonucu gerçekleşir.

Lokositlerin hücreler arası kompartmana geçişleri PECAM-1'in endotelial bağlantı noktalarındaki etkileşimi yardımıyla gerçekleşir. Ekstravasküler kompartmanda aktive lokositler ortama toksik ROS, proteaz ve elastaz salarlar ve bu durum mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankimal hücre ölümüne neden olur. Ekstravasküler kompartmana PMNL birikimi hipoksik dokulardan salınan IL-8 tarafından kolaylaştırılır. Böylece PMNL'ler intravasküler alandan hipoksik interstisyuma doğru yönlendirilir (20).



Şekil 2. Lokosit rolling, adezyon ve diapedezi

İskemik dokularda lokosit birikimi inflamatuvar hücrelerin postkapiller venüllerin endotelini kaplaması ile başlar. Lokositlerin adezyonu ve aktivasyonu ile doku aralığına emigrasyon gerçekleşir. Transmigrasyon esnasında mikrovasküler bariyer aktive lokositlerden salınan oksidan ve hidrolitik enzimlerce parçalanır. Mikrovasküler disfonksiyona bağlı protein kaçağı iskemi reperfüzyon hasarının en erken işaretlerinden biridir. Bunun önemi şudur ki, mikrovasküler permeabilitenin artışı transkapiller sıvı filtrasyonunu artırarak dönüş yolunda interstisyel sıvı basıncını da artırır. İskemi reperfüzyon hasarı nötrofil bağımlı hasar ile perikapiller doku basıncını artırarak, kapillerlerin kompresyonuna neden olur. Bu da dolaylı olarak reperfüzyonu önler (Kapiller no-reflow) (21).

No reflow fenomeni, vasküler oklüzyonun giderilmesinden sonra iskemik organdaki kan akımının tam olarak geri dönmemesi ile karakterize klinik durum olarak tanımlanır. Muhtemel mekanizmalar trombosit-lokosit agregasyonu, lokosit-endotelial hücre adezyonu, interstisyel sıvı birikimi ve endotel bağımlı vasorelaksasyonun azalmasıdır. No reflow fenomeni klinik olarak postperfüzyon sonrası dönemde organ disfonksiyonu (örneğin miyokardiyal stunning), transplante edilen greftde başarısızlık veya infarkt boyutunda artış olarak gözlenebilir (20).

2.2.4. İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proinflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9' dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj inflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF- α , IL-1 ve IL-6 üretimini uyararak inflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri şunlardır:

Vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1)

İnterselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1)

E-selektin

P-selektin

C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyararak lökosit aktivasyonu ve kemotaksisi artırır. Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar (15).

2.2.5. Çalışmada kullanılan iskemi reperfüzyon belirteçleri

2.2.5.1. SOD

Superoksit anyonu SOD tarafından H_2O_2 ye katalizlenir (22). SOD'ın memelilerde farklı genler tarafından kodlanan ancak benzer reaksiyonları katalizleyen üç izoformu mevcuttur. Sitosolik (CuZn-SOD veya SOD-1), mitokondride bulunan Mn-SOD veya SOD-2 ve ekstrasellüler form olan CuZn-SOD (EC-SOD veya SOD-3) (23).

2.2.5.2. MDA

İskemi reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimine neden olur ve bu durum endojen antioksidanların tüketimine ve azalmasına neden olur. Aşırı miktarda serbest oksijen radikali membran fosfolipidlerine saldırarak zincirleme lipid peroksidasyonuna neden olurlar, ilk olarak endotelial hücrelerde, hücrelerin sarkolemmal bütünlüğünü bozarlar. İn vivo olarak serbest oksijen radikallerinin direkt ölçümü zordur çünkü yüksek derecede reaktifdirler ve kısa yarı ömre sahiptirler. Serbest oksijen radikallerinin poliansatüre lipidlere hasarı sonucu oluşan, daha elverişli ve daha stabil bir ürün olan lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) ölçülebilir (16 , 24).

2.2.5.3. IL-6

IL-6 akut faz proteinlerinin salınımının modülasyonunda rol alır. IL-6; TNF- α ve IL-1 tarafından uyarılan makrofaj, monosit ve endotelial hücrelerden salınır. Köpeklerde çalışılan miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde IL-6'nın nötrofilleri aktive ettiği ve endotelial hücrelerde ICAM-1 up regülasyonunu indüklediği gösterilmiştir. Bu, IL-6'nın vasküler ICAM-1 upregülasyonuna neden olarak iskemi reperfüzyon hasarındaki etkilerini ortaya çıkardığını göstermektedir (25).

2.2.5.4. TNF- α

Sitokinler arasında TNF- α ve IL-1, inflamatuvar doku hasarı için invitro ve hayvan modellerinde en çok çalışılan sitokinlerdir. TNF- α vasküler permeabilitenin nötrofil bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla artmasına aracılık eder. Oksijen radikallerinin de TNF- α aracılı hasarda yer aldıkları gösterilmiştir. İn vitro ortamda süperoksit anyonunun temizlenmesi ile TNF- α duyarlı hücrelerin ölümü azalmıştır. Süperoksit anyonu ve TNF- α 'nın sinerjistik etkileri miyokardiyal iskemi reperfüzyon modelinde gösterilmiştir. Ratlarda oksijen radikallerinin temizlenmesi ile TNF- α aracılı ölümlerin azaldığı bildirilmiştir. TNF- α aracılı nötrofil akümüasyonu, nötrofillerde ve endotel hücrelerinde adezyon moleküllerinin up regülasyonu ile ilişkilidir. TNF- α 'nın iskemi reperfüzyon hasarındaki rolü, anti TNF- α antikollarının hepatik, intestinal ve bacak iskemisinde koruyucu etkisi ile gösterilmiştir. TNF- α aktivitesinin inhibisyonu ile renal ve kardiyak allogreftlerin akut rejeksiyon oranının azaldığı gösterilmiştir. İskemi reperfüzyon hasarında TNF- α plazma düzeyleri artar. TNF- α , IL1, IL6'nın ekstremitelerde iskemi reperfüzyonu sonrasında kas ve

akciğer vasküler hasarı ile ilişkili olduğu belirtilmektedir. TNF- α ve IL1 kas ve akciğer vasküler geçirgenliğinin artmasında önemli rol almaktadır. Her iki sitokinin akciğer ve kas dokusunda nötrofil birikiminde oldukça farklı rolleri olduğu gösterilmiştir (25).

Gaines ve ark. tarafından ratlarda yapılan alt ekstremitte iskemi reperfüzyon çalışmasında TNF- α nın iskelet kası hasarından da kısmen sorumlu olduğunu bildirilmiştir (26).

Yassin M. ve ark. ratların alt ekstremitelerinde uygulanan İ/R çalışmasında ortaya çıkan TNF- α , IL-1 β , IL-6 gibi mediyatörlerin serbest oksijen radikali ve lökositler aracılığı ile, hem lokal dokuda hem de uzak organlarda hasara neden olduğunu saptamışlardır (27).

2.2.5.5. ICAM-1

ICAM immunglobulin superalesinin bir üyesidir. Lökositlerin doku hasarı bölgesinde lokalize olmasını sağlarlar. Birçok sitokin, interferon δ , IL-1 ve TNF- α endotel hücre yüzeyinde ICAM oluşumunu indükler. ICAM-1 sitokinle uyarılmış hücre yüzeylerinde (endotel, lökosit, dermal fibroblastlar, melanositler) ve bazı karsinomlarda oluşur. ICAM-2 nötrofillerin doku hasarı bölgesine ilk lokalizasyonunda önemli rol oynar. ICAM-3 lökositlerde yapısal olarak bulunur ve CD 11a/CD 18 için ligandır. ICAM-3 monosit /makrofaj ve β hücrelerde fazla bulunur (28).

Lökosit–endotel etkileşimleri, iskemi reperfüzyon hasarı gelişen çeşitli organlardaki hasarda kritik rol oynarlar. Lökositlerin iskemi reperfüzyon sırasında dokuya transmigrasyonu, serbest oksijen radikalleri gibi doku hasarı ile ilişkili faktörlerin kaynağıdır. Bu transmigrasyon öncesinde lökosit yuvarlanma ve yapışması mikrosirkülasyonun venüler segmentinde spesifik adezyon molekülleri tarafından düzenlenerek artırılır. Lökosit adezyon ve transmigrasyonu yapısal olarak ICAM-1 ekspresyonu tarafından düzenlenir ve reperfüzyon sonrasında artar (29).

ICAM-1 monoklonal antikoları mezenterik mikrosirkülasyonda postiskemik lökosit adezyonunu %40, transmigrasyonunu %50 azaltmıştır (30). ICAM-1 ve P- selektinin birlikte bloke edilmesi akut reperfüzyon sonrası iskelet kasında mikrosirkülasyonu anlamlı olarak iyileştirmiştir (31). Aynı şekilde Merchant ve arkadaşları tarafından fare quadriceps kasında ICAM-1' in siklik peptid (IP25) tarafından inhibe edilmesi ile reperfüzyon esnasında nötrofil infiltrasyonunun ve doku nekrozunun azaldığı bildirilmiştir (32).

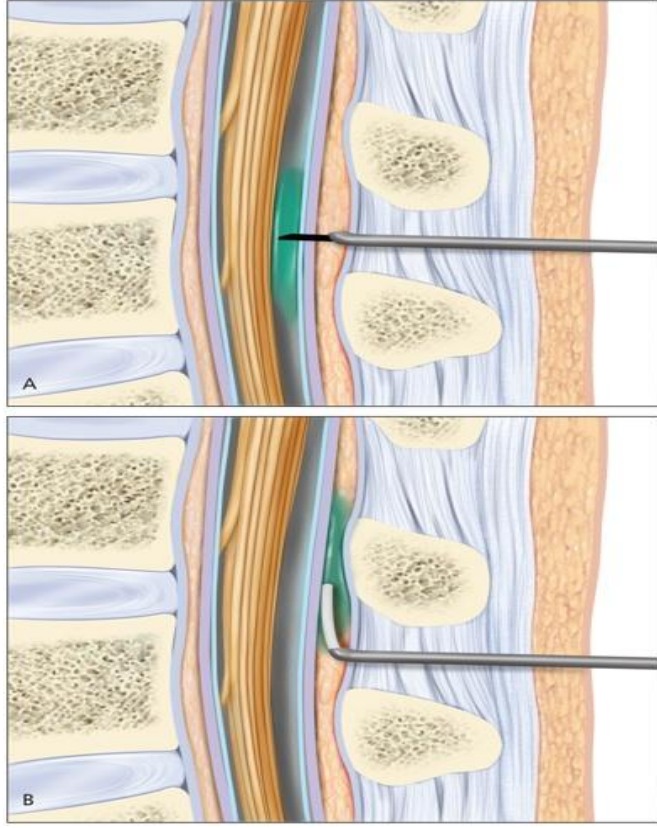
2.3. EPİDURAL ANESTEZİ

Epidural anestezi spinal sinirlerin duradan çıkıp, intervertebral foramenlere uzanırken epidural aralıkta lokal anestetik enjeksiyonu sonucu anestetize edilmesi ile meydana gelen bir tür bölgesel anestezi yöntemidir. Başlıca duysal ve semptomimetik lifler bloke olurken, motor sinirlerde kısmen veya tamamen bloke olabilirler. Anestetik solüsyonun verilme yerine göre, torakal, lumbal veya kaudal epidural bloklardan söz edilir. Epidural anestezide spinal anesteziden farklı olarak her yoğunlukta ve düzeyde blok sağlanabilir. Bu farklı blok düzeyleri, uygun ilaç, dozaj ve konsantrasyon seçimine bağlıdır (33). Epidural aralık; yukarıda foramen magnum, aşağıda sakrokoksigeal membran, yanlarda vertebra pedikülleri periostu ve intervertebral foraminalar, önde posterior longitudinal ligament ve intervertebral diskler ile vertebralardan çıkan sinir kökleri, arkada ise ligamentum flavumla sınırlıdır. Spinöz çıkıntılar, özellikle lomber bölgede genişler ve yukarıya doğru daralır. Epidural aralığın toplam volümü 118 ml olarak bulunmuştur.

Torasik bölgede en fazla, sakralde en az olmak üzere hastaların % 80'inde negatif basınç mevcuttur. Lumbal bölgede epidural aralık en geniştir (5–6 mm) ve ligamanlar bu bölgede kalındır. Aralık genişliği toraks bölgesinde 3–5 mm iken servikotorasik bölgede 2–3 mm'ye düşer. Cilt ve epidural boşluk arası 4–6 cm olup, şişmanlarda 8 cm, zayıflarda 3 cm'e kadar değişebilir.

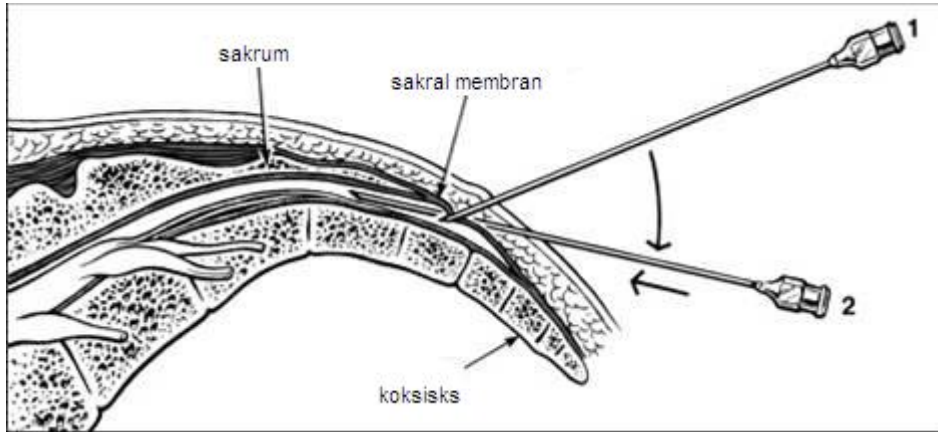
Epidural aralık, gevşek areoler doku, yağ dokusu, dural kılıfları ile birlikte spinal sinirler, damarlar ve lenfatikleri içerir. İntervertebral venöz pleksuslar, lokal anestetik ilaçlar için geniş absorpsiyon yüzeyi oluşturarak, ilacın difüzyonla sistemik dolaşıma geçip etkinin azalmasına yol açar. Öksürme, ıkınma sırasında ya da büyük abdominal kitleler ve gebeliğin geç döneminde meydana gelen vena kava basısı ile venlerde genişleme, epidural aralıkta daralma olur; böylece daha düşük volüm ve konsantrasyonla yeterli anestezi ve analjezi sağlanır (33,34).

Epidural aralığa Tuohy iğnesiyle doğru noktadan girildiğinde sırasıyla cilt, cilt altı, supraspinöz ve interspinöz ligamanlar, daha sonra kalın ligamentum flavuma ulaşılmaktadır. Ligamentum flavum geçildiğinde epidural aralığa ulaşılmış olunur (şekil 1). İğne daha fazla ilerletilirse dura delinebilir. Dura delindiğinde ikinci bir direnç kaybı oluşur ve bu durumda, enjektör iğneden ayrıldığında serebrospinal sıvı gelir. (33)



Şekil 3. Epidural kateter yerleştirilmesi

Kaudal aralık epidural aralığın sakral bölümüdür. Kaudal anestezi, epidural anestezi formlarından biridir. Sakral ve alt lomber sinirlerin bloğu için çok uygundur. Verilen ilacın miktarına göre seviye yükseltilebilir. Daha yüksek blok için, bu yolla büyük miktarda ilaç vermek gerektiğinden lumbal epidural enjeksiyon tercih edilmelidir. Kaudal blok ilk olarak 1901 yılında Cathelin ve Sichard tarafından uygulanmıştır (Şekil 2). Kaudal anestezi bugün daha çok pediatrik hastalarda postoperatif analjezi amaçlı uygulanmaktadır (33,35).



Şekil 4. Kaudal epidural blok

Epidural aralığa verilen lokal anestetik, volüme bağlı olarak yukarı ve aşağıya doğru yayılır. Lokal anesteziğin bir kısmı vasküler absorpsiyonla sistemik dolaşıma geçer. Kandaki lokal anesteziğin miktarı 20-30 dakika içinde en üst düzeye ulaşır. Bu dönemde sistemik etkiler yönünden hastanın yakından izlenmesi gerekmektedir. Epidural bloğun gerçekleşmesinde verilen lokal anesteziğin kimyasal özellikleri de önemli rol oynamaktadır. Lipidde eriyen lokal anestetiklerin epidural enjeksiyonundan sonra doku engellerinden geçerek spinal korda ulaşması kolay olur bu yüzden daha etkili olurlar. Asidoz, hipoksi, hiperkapni, lokal anesteziklerin doku tarafından alınmasını etkileyerek etkinliğini azaltırlar. Hipotermi varlığı da lokal anesteziklerin karaciğerde biyotransformasyonunu etkiler (33).

Epidural aralığa verilen lokal anestezikler etkilerini aşağıda sıralanan bölgelerde gösterirler.

1. Epidural aralıktaki sinir köklerinde,
2. Paravertebral alanda dural kılıfını kaybetmiş sinir köklerinde,
3. İntradural bölgedeki sinir köklerinde,
4. Subperinöral ve subpial boşluklara diffüze olarak etkilerini gösterirler.

Bu yollar ile etkilenen sinirler; anterior kökler, posterior kökler ve ganglionları, miks spinal sinirler, visseral afferent lifler, ak ve gri komünikan dallardır (36).

L5 ve S1'deki çok büyük spinal sinirler, epidural boşlukta bloke edilmesi en zor sinirlerdir ve bu sinir köklerinin baskılanmasını gerektiren cerrahi işlemler epidural anestezi ile diğer bölgesel tekniklerde olduğundan çok daha zor olabilir (37).

Lokal anestetik solüsyonun subaraknoid veya epidural aralığa verilmesinden sonra ilk olarak preganglionik sempatik lifler etkilenir. Daha sonra otonom liflerden kalınlıklarına göre ağrı, ısı, dokunma ve son olarak basınç duyusunu taşıyan lifler bloke olur. Sırası ile sempatik, duyu ve motor blok oluşur (38). Bloğun geri çekilmesi ise bunun tam tersidir. Önce motor blok, sonra sensoryal blok, sonra da sempatik blok ortadan kalkar. Sempatik blok sensoryal bloktan 2-4 segment yukardadır. Motor blok ise sensoryal bloktan iki segment aşağıdadır (39).

2.3.1.TAVŞANLARIN EPİDURAL ANATOMİSİ

Tavşanların kolumna vertebralis insanlardan farklı olarak 7 servikal, 12 torakal, 7 lomber, 4 sakral ve 15-16 kaudal vertebradan oluşmuştur. Vertebralar; yassı kemik

silindir, vertebra korpusu ve diğer parçalar olarak 3 bölümde değerlendirilir. Spinal kanal ve spinal kordu çevreleyen nöral ark yassı kemiklerden oluşmuştur. Korpusun dorsolateralinde transvers, spinal arkusun arkasında orta hatta ise spinöz çıkıntılar bulunur. Vertebra korpusları arasında vertebral disk yer alır. Lomber bölgede bulunan transvers ve spinöz çıkıntılar kraniyale doğru açıktır. Bu nedenle tavşanlarda lomber spinal anestezi uygulamaları için iğnenin doğrultusu kaudale doğru yönlendirilmelidir. Torakal bölgedeki spinöz çıkıntılar ise kaudale doğru açıktır. Spinöz çıkıntılardaki açılma tavşanlarda spinal ve epidural anestezi uygulamalarını kolaylaştırması açısından önemlidir. Arkusu oluşturan laminalardan çıkan diğer kemik çıkıntılar pre-zygapophyses, post-zygapophyses, metapophyses şeklinde adlandırılırlar.

Tavşanların medulla spinalis kılıfları insanlardaki gibi piamater, araknoid ve duramaterden oluşur. Duramater spinalis, intrakraniyal duranın iç meningeal yaprağı olarak devam eder. Foramen magnumdan başlayıp, spinal kordun etrafını sarıp, sakral ikinci vertebra hizasında sonlanır. İçindeki spinal kord ise L7 vertebra hizasında conus medullaris yapar.

Tavşanlarda spinal kord servikal ve lomber bölgelerde geniştir. Spinal korddan 8 servikal, 12 torasik, 7 lomber, 4 sakral, 6 kaudal spinal sinir çıkar. Sakrumun ortalarından itibaren kauda equina oluşur ve filum terminale olarak kuyruğa kadar devam eder. Posterior spinal sinirler de vertebral kolondaki foramenlerden çıkar.

Tavşanlarda dural sak ve içindekileri çevreleyen epidural aralık ise foramen magnumdaki kemik periostundan başlar, koksigeal kemikler arasında sonlanır. Epidural aralığın ön duvarını vertebraların posterior longitudinal ligamanı ve intervertebral diskler, arka duvarını ligamentum flavum, yanlarını ise vertebra arkularının periostu oluşturur. Epidural aralık içinde insanlardaki gibi yağ dokusu, damarlar ve spinal sinirler bulunur (40,41).

2.3.2 Epidural anestezi alt ekstremité dolaşımı üzerine etkileri

Epidural anestezi ile oluşturulan sempatik blok anestezi - brachial indeksi azalmış hastalarda alt ekstremité kan akımını artırması nedeniyle, alt ekstremité iskemisi ile başvuran vasküler rekonstrüksiyon yapılacak hastalarda avantajlı olabilir. Epidural anestezi boyunca hemodinamik durum genel anesteziye göre daha stabil seyreder. Genel anestezi alt ekstremité kan akım hızını artırmaz, aksine genel anestezi sonunda artmış

stres cevaba bağlı vazokonstriksiyon bacak ve greft kan akımını daha fazla bozmaktadır. Epidural anesteziye bağlı sempatik blok sayesinde kardiyovasküler sistem üzerindeki yük, epidural anesteziye göre belirgin olarak daha azdır. Greftdeki düşük akım hızı bypass greftdeki başarısızlığın bir belirleyicisidir. Bu nedenle regional anestezi ile sağlanan greft akım hızının artırılması ve postoperatif dönemde de bunun sürdürülmesi, greft açıklığı ve açık kalma süresine yardımcı olması yönünden önemli olabilir (42). Tuman ve arkadaşları genel anesteziye kombine edilen epidural anestezinin postoperatif hiperkoagülabileteyi azaltabileceğini ve vasküler cerrahi geçiren hastalarda tromboembolik olayları azaltabileceğini bildirmişlerdir (43).

Yapılan çalışmalarda epidural anestezinin, genel anesteziye göre daha iyi greft açıklığı sağladığı bildirilmiştir (43,44). Bu bulguyu açıklamak için Perler ve arkadaşları genel anestezi ve artmış plazminojen aktivatör inhibitör 1 düzeylerinin daha yüksek oranda greft oklüzyonuna neden olduğunu öne sürmüşlerdir (45). Rosenfeeld ve arkadaşları postoperatif plazminojen aktivatör inhibitörü 1'in genel anestetik grupta arttığını, epidural anesteziye ise anlamlı bir artış olmadığını bildirmişlerdir (46). Parker ve arkadaşları epidural anesteziye greft açıklığının stres modülasyonuna bağlı olduğunu bildirmiştir (47).

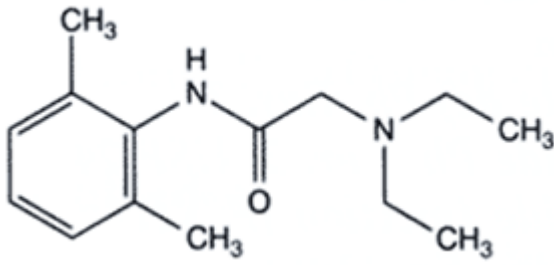
Epidural anestezi alt ekstremitelerde arteriyel inflowu artırarak ve venöz boşalmayı sağlayarak postoperatif alt ekstremitelerde kan akımını artırır (48). 20 hastada yapılan başka bir prospektif çalışmada femorodistal bypass yapılan hastalarda epidural anestezinin greft kan akımını artırdığı ve bu nedenle femorodistal rekonstrüksiyon yapılacak hastalarda epidural anestezinin faydalı olabileceği bildirilmiştir (49). Yüceyar ve ark. aortofemoral cerrahiye giden hastalarda epidural anestezinin lipid peroksidasyonunu azalttığı bildirilmiştir (50).

2.3.3. LİDOKAİN

Kimyasal ismi 2-(diethylamino)-N-(2,6-dimethylphenyl) acetamid'dir. Formülü $C_{14}H_{22}N_2O$ olup molekül ağırlığı 234.34 g/mol'dur (şekil 1). Lidokain, lokal anestetik ve antiaritmiktir. Etkisi 30-90 saniye içinde başlar. Yarılanma ömrü 90-120 dakikadır. Karaciğer fonksiyon bozukluğu ve konjestif kalp yetmezliğinde yarılanma süresi uzar. Karaciğerde metabolize edilen lidokainin metabolitleri idrar ile atılır. Lidokain, hücre membranındaki hızlı sodyum kanallarını bloke ederek nöronal depolarizasyonu değiştirir.

Depolarize olamayan membran, aksiyon potansiyelini iletmez ve bu durum lidokainin lokal anestetik etkinliğinin temelini oluşturur (51).

Lidokain amid yapılı lokal arasında en kısa etki süreli iki ilağtan biridir. Kaudal veya lomber epidural anestezi için % 1'lik , % 1,5'luk veya %2 lik solüsyon kullanılır. Kalp cerrahisi, kalp kateterizasyonu, ve akut miyokard infarktüsü sırasında gelişen akut ventriküler aritmilerin önlenmesinde ve ortadan kaldırılmasında intavenöz yoldan verilmek suretiyle başarı ile ve sık kullanılan bir antiaritmiktir (52).



Şekil 5. Lidokainin kimyasal yapısı

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Konya Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi'nde gerçekleştirildi. Alınan biyokimyasal örnekler Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı'nda, patolojik örnekler de Selçuk Üniversitesi Selçuklu Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı'nda incelendi.

Çalışmanın planlanmasını takiben Selçuk Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma ve Uygulama Merkezi Deney Hayvanları Etik Kurulu'ndan 23/08/2011 tarih 20011 - 092 karar sayısı ile onay alındı. Proje finansmanı için Necmettin Erbakan Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Ofisi'nden 121518011 proje numarası ile kısmi maddi destek sağlandı.

3.1. Denekler

Çalışmada, ağırlıkları 1750 - 2800 gram arasında değişen 36 adet erkek Yeni Zelanda cinsi beyaz tavşan kullanıldı. Tüm tavşanlar deney gününe kadar standart laboratuvar yemi ile beslendi. Su içmelerine izin verilerek 12 saat süre ile aç bırakıldı.

3.2. İlaçlar

Ketamin: Ketalar flakon (50 mg/ml, Eczacıbaşı İlaç ve Ticaret A.Ş. İstanbul - Türkiye) 50 mg/kg dozunda intramusküler olarak anestezi sağlamak amacıyla verildi.

Ksilazin: Rompun flakon (23.32 mg/ml, Bayer Türk Kimya Sanayi Limited A.Ş. İstanbul - Türkiye) 10 mg/kg dozunda intramusküler olarak analjezi amacıyla verildi.

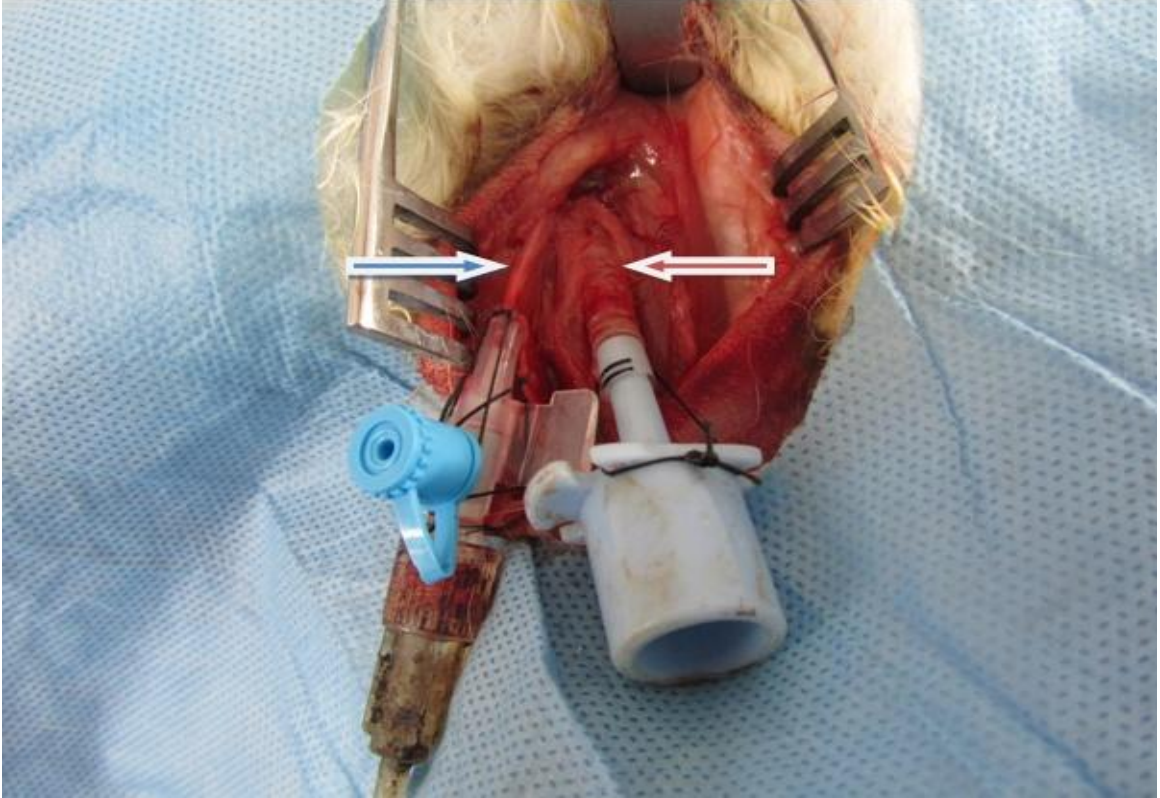
Lidokain: Aritmal %2 ampul (20 mg/ml, ADEKA İlaç Sanayi ve Ticaret A.Ş. Samsun – Türkiye) Epidural anestezi sağlamak için % 0.5'lik olacak şekilde seyreltilip epidural kateterden önce 0.4 ml/kg bolus verilip takibinde 0.1 ml/kg dozunda infüzyon şeklinde verildi.

3.3. Anestezi

Çalışma öncesinde su içmelerine izin verilmek koşulu ile 12 saat aç bırakılan tavşanların tümünde cerrahi girişim, enjeksiyonlar, kan ve doku örneklerinin alınması sol ön bacdktan uygulanan intramusküler 50 mg/kg ketamin ve 10 mg/kg ksilazin anestezisi altında yapıldı. Gerektiğinde ek doz uygulandı.

3.4. Cerrahi Prosedür

Anestezi uygulaması sonrası tavşanların kulak, boyun, sağ inguinal ve kuyruk bölgeleri traş edildi. Ardından traşlanmış alanlar betadin solüsyonu ile temizlendi. Tüm deneklere, kulak veninden venöz damar yolu amacıyla 22 gauge IV kanül (plusMED Damar İçi Kateter, Trimpeks İth. İhr. Tur. Ve Tic. A.Ş. İstanbul – Türkiye) yerleştirildi. Tüm deneklere, bu venden 15 ml/kg/saat dozunda Ringer Laktat (Laktatlı Ringer Solüsyonu, Eczacıbaşı-Baxter Hastane Ürünleri San. Ve Tic. A.Ş. İstanbul – Türkiye) infüzyonu verildi, devamlı elektrokardiyografi ile ritm ve nabız monitorizasyonu (Horizon 2000, Mennen Medical Inc. Rehovot, Israel) yapıldı. Tüm deneklerde, boyun ön bölgesinden yapılan vertikal kesi ile girilerek sol karotis arter bulunup 22 gauge kanül (plusMED Damar İçi Kateter, Trimpeks İth. İhr. Tur. Ve Tic. A.Ş. İstanbul – Türkiye) yerleştirilerek devamlı kan basıncı monitorizasyonu yapıldı. Ayrıca, solunum sıkıntısı gelişmesi durumunda hızlı müdahale sağlayabilmek amacıyla tüm deneklere, aynı boyun kesisi üzerinden trakea eksplore edilerek 3.5 mm trakeostomi kanülü yerleştirildi (Resim 1).



Resim 1: Yerleştirilmiş sol karotis arter ve trakeostomi kanülü (mavi ok: sol karotis arter, kırmızı ok: trakea)

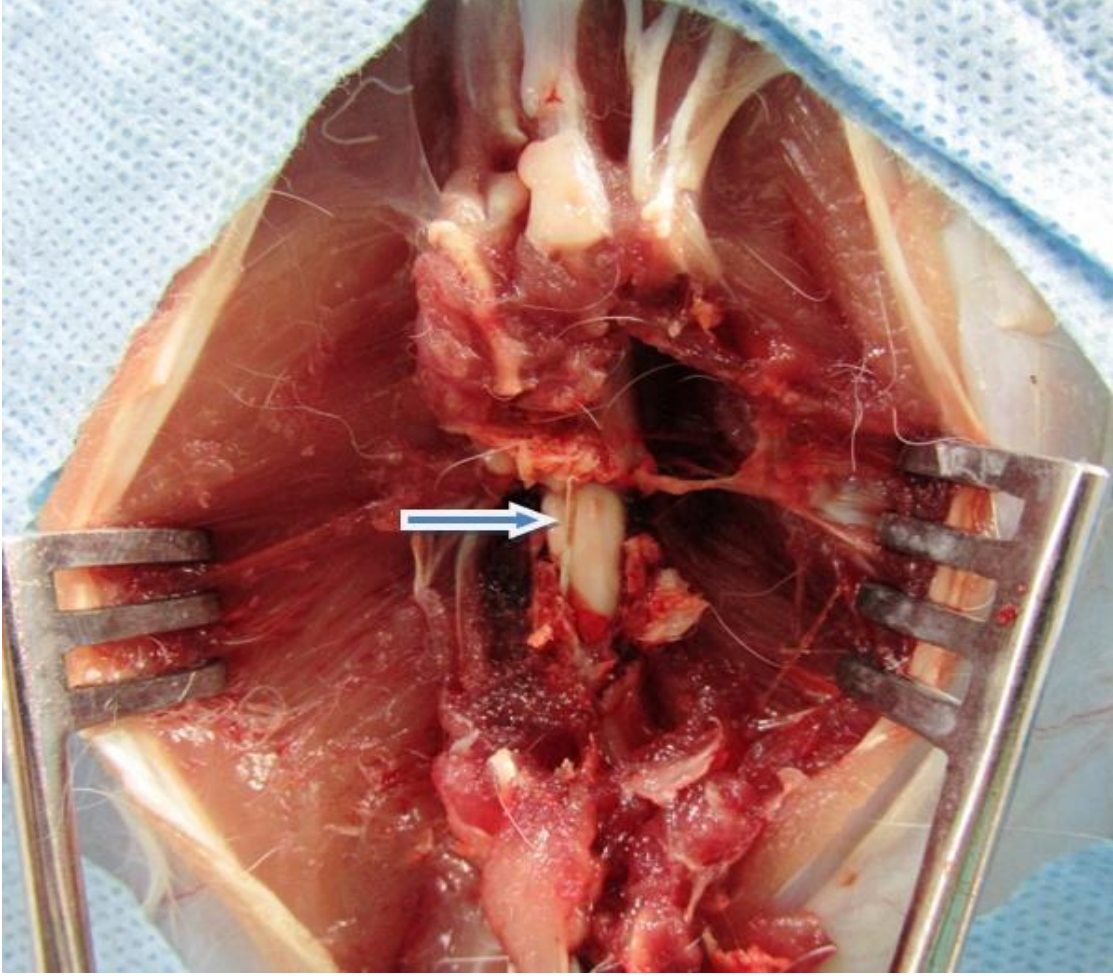
3.4.1. Epidural kateter yerleştirilmesi

Ketamin ve ksilazin anestezisi sonrasında kuyruk bölgesi traş edilen denekler prone pozisyonda iken kuyruk bölgesi %10 povidon–iodine ile temizlendi. Daha sonra kuyruk anüsten 1 cm distalde olacak şekilde eklem aralığı hissedilerek ampute edildi. Sakral kanal eksplore edildi. Epidural kateter iğnesi ile sakral kanala girildi. 19 gauge epidural kateter (Balton Epidural Anaesthesia Set Small 19 G, Balton Ltd, Poland), sefalik yönde L1 – L2 seviyesine gelecek şekilde 15 cm ilerletildi (Resim 2). Kateter tünel vasıtası ile ciltaltından çıkarılıp tespit edildi. Kuyruk bölgesinde cilt primer sütüre edildi.



Resim 2: Kaudal yöntemle girilerek yerleştirilmiş epidural kateter (mavi ok: epidural kateter, kırmızı ok: sakral kanal)

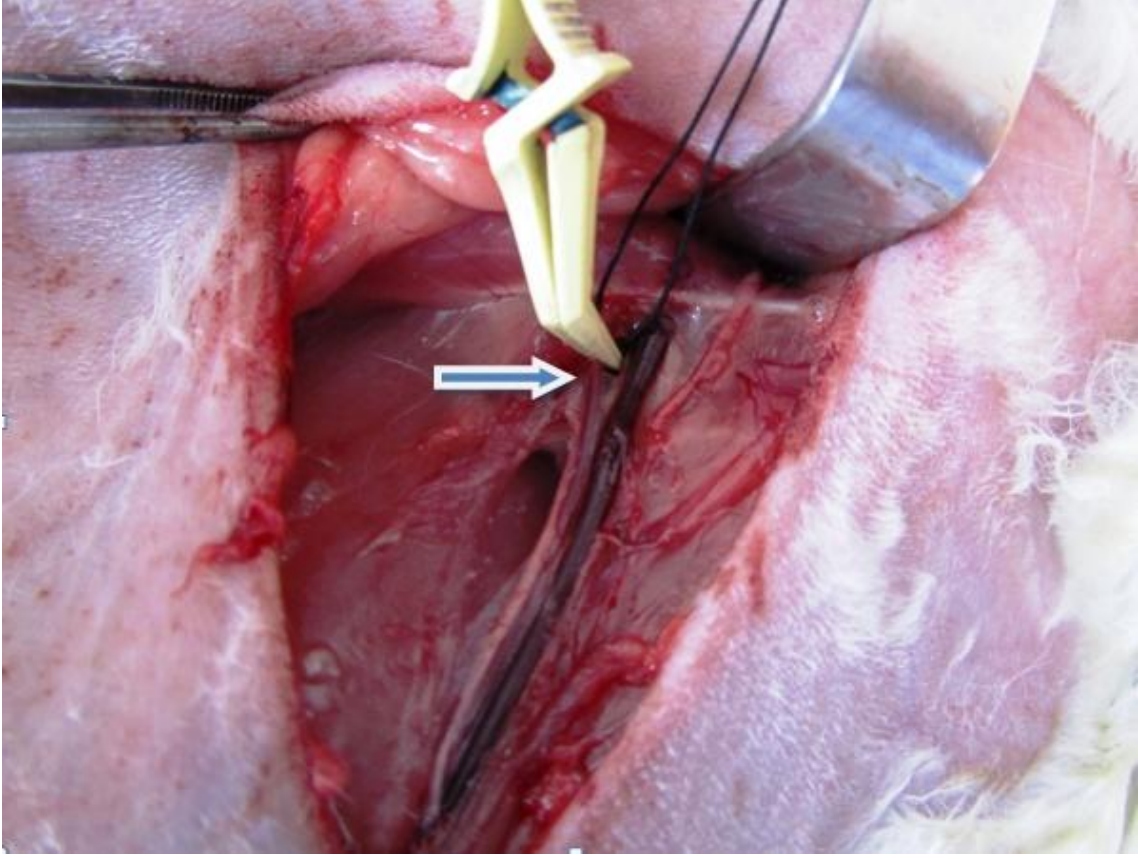
Denek, tekrar supin pozisyona çevrildi. Epidural kateter takılan tüm denekler, sakrifiye edildikten sonra vertebral kolon açılarak epidural kateterin yeri doğrulandı (Resim 3).



Resim 3: Kemik yapılar uzaklaştırıldıktan sonra epidural kateterin yerinin doğrulanması (ok: epidural kateter)

3.4.2. Ana femoral arter eksplorasyonu

Sağ inguinal bölgeden yaklaşık 3 cm'lik vertikal insizyon yapılarak inguinal ligamanın hemen distali seviyesinde ana femoral arter eksplore edildi. Femoral arter 2/0 ipek ile dönüldü. Daha sonra sarı renkli plastik bulldog klemp (Vascu-Stat II bulldog clamps, Scanlan Group, USA) kullanılarak ana femoral arter kleplendi. (Resim 4). Kollateral oluşumu engellemek amacıyla ekstremité proksimalden lastik turnike ile sıkıldı. Arteriyel akımın durduğu manuel doppler ultrasound ile teyid edildi.



Resim 4: Ana femoral arterin klemlenmesi (ok: femoral arter)

3.5. Deney grupları

Grup I (kontrol grubu), kontrol grup olup sadece sağ inguinal bölgeden yapılan insizyonla ana femoral arter eksplorasyonu yapıldıktan sonra 2/0 ipek ile dönüldü, klemp ve turnike uygulanmadı.

Grup II (İR grubu), İR grubu olup, sağ inguinal bölgeden yapılan insizyonla ana femoral arter eksplorasyonu yapıldı. Ana femoral arter klemlenerek ve ekstremiteye lastik turnike uygulanarak 150 dakika alt ekstremitte iskemisi oluşturulup klemp ve turnike kaldırdı, takibinde 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

Grup III (İR + epidural anestezi grubu), İR ve epidural anestezi uygulanan çalışma grubu olup, önce tavşanlara kaudal teknikte epidural kateter yerleştirildi ve iskeminin başlaması ile birlikte buradan % 0.5'lik lidokain önce 0.4 ml/kg bolus verilip takibinde 0.1 ml/kg dozunda infüzyona İR süresince devam edildi. Sağ inguinal bölgeden yapılan insizyonla ana femoral arter eksplorasyonu yapıldı. Ana femoral arter klemlenerek ve

ekstremitelere lastik turnike uygulanarak 150 dakika alt ekstremitelere iskemi oluşturulup klempe ve turnike kaldırdı, takibinde 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

Grup IV (epidural kontrol grubu), epidural anestezi kontrol grubu olup, tavşanlara kaudal teknikle epidural kateter yerleştirildi ve buradan Grup III'de verilen dozda % 0.5'lik lidokain önce 0.4 ml/kg bolus verilip takibinde 0.1 ml/kg dozunda infüzyona, toplam iskemi ve reperfüzyon süresi olan 270 dakika boyunca devam edildi. Sağ inguinal bölgeden yapılan insizyonla ana femoral arter eksplorasyonu yapıldı. Ana femoral arter 2/0 ipekle döndü. Klempe ve turnike uygulanmadı.

3.6. Kan ve doku örneklerinin alınması

Kan ve doku örnekleri, femoral arter klemplenmesi ve alt ekstremitelere turnike uygulamasından 270 dk (150 dk iskemi + 120 dk reperfüzyon süresi dolduktan) sonra alındı. İskemi reperfüzyon süresi dolduktan sonra sağ femoral ven 22 gauge kanül (plusMED Damar İçi Kateter, Trimpeks İth. İhr. Tur. Ve Tic. A.Ş. İstanbul – Türkiye) ile kanüle edildi. Kan örnekleri, iskemi uygulanan tarafta femoral vendeki bu kanülden alındı. Tavşanlardan alınan kan örnekleri santrifüj edilerek serumları ayrıldı ve kapaklı tüplerde çalışma süresine kadar -80° C'de saklandı. Doku biyokimyasal incelemesi için, gastrocnemius kası ve immunohistokimyasal inceleme için gastrocnemius kası ve yüzeysel femoral arter eksize edildi. Denekler işlem sonrası intravenöz ketamin ile sakrifiye edildi. Alınan patoloji örnekleri tamponlu % 10'luk formalin solüsyonuna konulup ilgili patoloğa ulaştırıldı. Hematoksilen eosin ve immunohistokimyasal metodla incelendi. Biokimyasal inceleme için alınan gastrocnemius kası kapaklı tüplerde çalışma süresine kadar -80° C'de saklandı.

-80° C'de saklanan serum örnekleri, çalışma için oda ısısında sıvı hale getirildi ve elde edilen serumlarda IL-6 ve TNF- α düzeyleri, gastrocnemius kasında SOD aktivitesi ve MDA düzeyi ölçüldü. Patolojik inceleme hematoksilen eosin boyama ve immunhistokimyasal metodla femoral arter endotelinde ve kas doku vasküler endotelde ICAM-1 ekspresyonu değerlendirildi.

3.7. İR belirteçlerinin ölçümü

3.7.1. IL-6 düzeyi ölçümü

IL-6 düzeyleri ELISA tekniği ile ve Rabbit İnterlökin-6 (Cusabio Biotech Co. Ltd, China) isimli ticari kit kullanılarak belirlendi. Yöntemin saptayabildiği en düşük IL-6 konsantrasyonu 15.6 pg/ml' dir. Standartların konsantrasyonlarına karşı 450 nm' deki absorbansları kullanılarak standart eğrisi elde edildi ve bu eğriden elde edilen denklemde örneklerin absorbans değerleri girilerek konsantrasyonları pg/ml olarak hesaplandı.

3.7.2. TNF- α düzeyi ölçümü

TNF- α düzeyleri ELISA tekniği ile ve Rabbit Tumor Necrosis Factor- α (Cusabio Biotech Co. Ltd, China) isimli ticari kit kullanılarak belirlendi. Yöntemin saptayabildiği en düşük TNF- α konsantrasyonu 78,13 pg/ml' dir. Standartların konsantrasyonlarına karşı 450 nm' deki absorbansları kullanılarak standart eğrisi elde edildi ve bu eğriden elde edilen denklemde örneklerin absorbans değerleri girilerek konsantrasyonları pg/ml olarak hesaplandı.

3.7.3. SOD aktivitesi ölçümü

SOD enzimi, superoksit radikalini substrat olarak kullanır. Bu deneyin prensibi; ksantin / ksantin oksidaz sistemi tarafından oluşturulan süperoksit radikalinin ortamda bulunan nitroblue tetrazolium (NBT) bileşiğini redüklemesi esasına dayanır. Reaksiyon ortamına ilave edilen (doku homojenatında bulunan) SOD enzimi oluşan süperoksit radikallerini ortamdan uzaklaştırarak, aktivitesiyle doğru orantılı olarak NBT'nin redüksiyonunu engeller (53). Redüklenmiş NBT menekşe rengindedir ve spektrofotometrede, 560 nm dalga boyunda absorbans verir. Ortama SOD ilave edilerek bulunan absorbans değeri, enzimin ilave edilmediği kör deneyinin absorbansıyla mukayese edilerek enzim aktivitesi hesaplanır. Kör ve numunelere ait absorbanslar spektrofotometrede, 560 nm'de distile suya karşı okunduktan sonra, SOD aktivitesi ünite tarifine (1 ünite SOD aktivitesi, NBT'nin redüklenmesini % 50 oranında inhibe eden enzim miktarı olarak tanımlanmıştır) göre hesaplandı. SOD aktivitesi hesaplandıktan sonra protein konsantrasyonuna bölündü ve ölçüm sonucu "U/mg protein" olarak ifade edildi.

3.7.4. MDA düzeyi ölçümü

Doku MDA seviyesi tayininde spektrofotometrik ölçüm metodu kullanıldı. Bu metoda göre, MDA ile tiyobarbitürik asitin reaksiyona girmesi sonucu ortaya çıkan pembe renkli bileşiğin absorbansı, spektrofotometrede, 532 nm dalga boyunda ölçüldü. Bu ölçümde MDA standardı olarak tetraetoksipropan kullanıldı. Elde edilen MDA değeri (nmol/ml), protein konsantrasyonuna bölündü ve ölçüm sonucu “nmol / mg protein” olarak ifade edildi (54).

3.8. İmmunohistokimyasal inceleme

İmmunohistokimyasal metodla İR hasarı, çalışmaya kör bırakılan bir patolog tarafından değerlendirildi. Formalin fikse edilmiş parafin bloklardan elde edilen 4 µm kalınlığındaki kesitler poly-L-Lizin kaplı lamlara alınarak, 70 °C'lik etüvde 1 saat bekletildi. Sonrasında 5'er dakikalık ksilen serilerinden geçirilerek deparafinize edilen kesitler, 3'er dakikalık alkol serilerinden geçirilerek dehidratasyon sağlandı. Ardından 1 dakika distile suda yıkandı. Bu işlemi takiben, antijen geri alımının sağlanabilmesi için, 10mM sitratlı tampon (ph:6) solüsyonu içinde, düdüklü tencerede 3 dakika kaynatıldı ve aynı tampon içerisinde oda ısısında 40 dakika soğutuldu.

İmmunohistokimya prosedürü için ImmunoCruz Rabbit LSAB Staining System (sc-2051, SantaCruz Biotechnology Inc.) kullanıldı. İlk olarak, endojen peroksidaz aktivitesini ortadan kaldırmak için peroxidase blocking reagent ile bloklama işlemine tabi tutulup 5 dakika inkübasyon yapıldı ve 4 dakika Fosfat Buffer Solüsyonu (PBS) ile yıkandı. Sonrasında 20 dakika serum blok uygulandı ve ardından 4 dakika PBS ile yıkandı. Bu işlemi takiben kesitlere 1:200 dilüsyon oranında Rabbit Anti- CD54 / ICAM-1 (bs-4615R, Bioss antibodies, USA) primer antikoru uygulandı ve 2 saat inkübasyona bırakıldı. Sonrasında lamlar PBS'de 4 dakika yıkanıp, biotinylated sekonder antikor damlatılıp 30 dakika inkübasyon yapıldı. Tekrar PBS' de 4 dakika yıkanarak, HRP Streptavidin complex damlatıldı ve 30 dakika inkübasyonda bırakıldı. 4 dakikalık PBS yıkaması tekrarlandı. Sonrasında diaminobenzidine (DAB) kromojen damlatılıp, 7-8 dakika inkübe edildi ve distile suda yıkandı. Dokular Hematoksilen boya ile 1 dakika boyandı. Ardından distile suda 2-3 dakika yıkanıp alkol

serilerinden geçirildi. Havada kurutulan preparatlar ksilene konularak entellan ile kapatıldı. Femoral arter ve gastroknemius mikrovasküler endoteli ICAM1 ekspresyonu değerlendirilmesinde Khandoga ve ark. (55) değerlendirme skoru referans alınarak, immunohistokimyasal bulguların skorları; (-) boyama yok 0 puan , (+) hafif boyama 1 puan , (++) orta şiddette boyama 2 puan ve (+++) şiddetli boyama 3 puan olarak derecelendirilerek hesaplandı.

3.9. İstatistiksel Yöntem

Deneyisel çalışmada elde edilen veriler bilgisayar ortamında istatistik yazılım programı olan SPSS (SPSS version 16.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) programı ile analiz edildi. Sayısal değişkenler, ortalama \pm standart sapma ve ortanca (1. çeyreklik -3. çeyreklik) şeklinde sunuldu. Biyokimyasal verilerin normal dağılıma uygunluk analizi Bir-örnek Kolmogorov-Smirnov testi ile yapıldı. Bu verilerin istatistiksel olarak değerlendirilmesinde, gruplar arasındaki farklılıklar One –way ANOVA ve bunu takiben ikincil test olarak Tukey-HSD parametrik testleri kullanılarak karşılaştırıldı. İmmunhistokimyasal verilerin istatistiksel değerlendirilmesinde, gruplar arası anlamlı farkların belirlenmesinde Kruskal-Wallis testi ve bunu takiben ikincil test olarak da Bonferroni düzeltmeli Mann-Whitney U testi kullanıldı. *P* değerinin 0.05'ten küçük olması (Bonferroni düzeltmesinde $p < 0.01$ olması) istatikselsel olarak anlamlı kabul edildi.

4. BULGULAR

Deney hayvanlarının vücut ağırlıkları; kontrol grubu 1854 ± 81 gram, İR grubu 2026 ± 240 gram, İR + epidural anestezi grubu 2113 ± 248 gram, epidural anestezi grubu 2096 ± 355 gram idi. Gruplar arası ağırlık bakımından istatistiksel anlamlılık yoktu ($p > 0.05$).

4.1. BİYOKİMYASAL BULGULAR

Gruplara ait doku ve serum örneklerinden elde edilen biyokimyasal değerlerin sonuçları ortalama ve \pm standart sapma şeklinde Tablo 2’de gösterilmiştir.

Grup	Serum düzeyleri		Doku düzeyleri	
	TNF- α (pg/ml)	IL-6 (pg/ml)	MDA (nmol/mg protein)	SOD (U/mg protein)
Kontrol	955 ± 436	59 ± 16	0.19 ± 0.07	$1,82 \pm 0.11$
İR	1559 ± 293	87 ± 12	0.40 ± 0.07	$2,01 \pm 0.16$
İR + epidural anestezi	1163 ± 333	66 ± 22	0.31 ± 0.04	$2,00 \pm 0.08$
Epidural anestezi	906 ± 465	54 ± 16	0.24 ± 0.03	$1,82 \pm 0.06$

Tablo 2: Biyokimyasal değerlerin sonuçları

Serum TNF- α değerleri karşılaştırıldığında;

İR grubu ile kontrol grubu ve epidural anestezi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p < 0.05$). İR grubu ve İR+ epidural anestezi grubu arasında TNF- α değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı ($p > 0.05$).

Serum IL-6 değerleri karşılaştırıldığında;

IR grubu ile kontrol grubu ve epidural anestezi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). IR grubu ve IR+ epidural anestezi grubu arasında TNF- α değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı($p>0.05$).

Kas doku MDA değerleri karşılaştırıldığında;

IR grubunda MDA değerleri diğer gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). IR+ Epidural anestezi grubu MDA değerleri ;kontrol grubu ve epidural anestezi grubuna göre anlamlı yüksek($p<0.05$), IR grubuna göre istatistiksel anlamlı düşük bulundu($P<0.05$).

Kas doku SOD değerleri karşılaştırıldığında ;

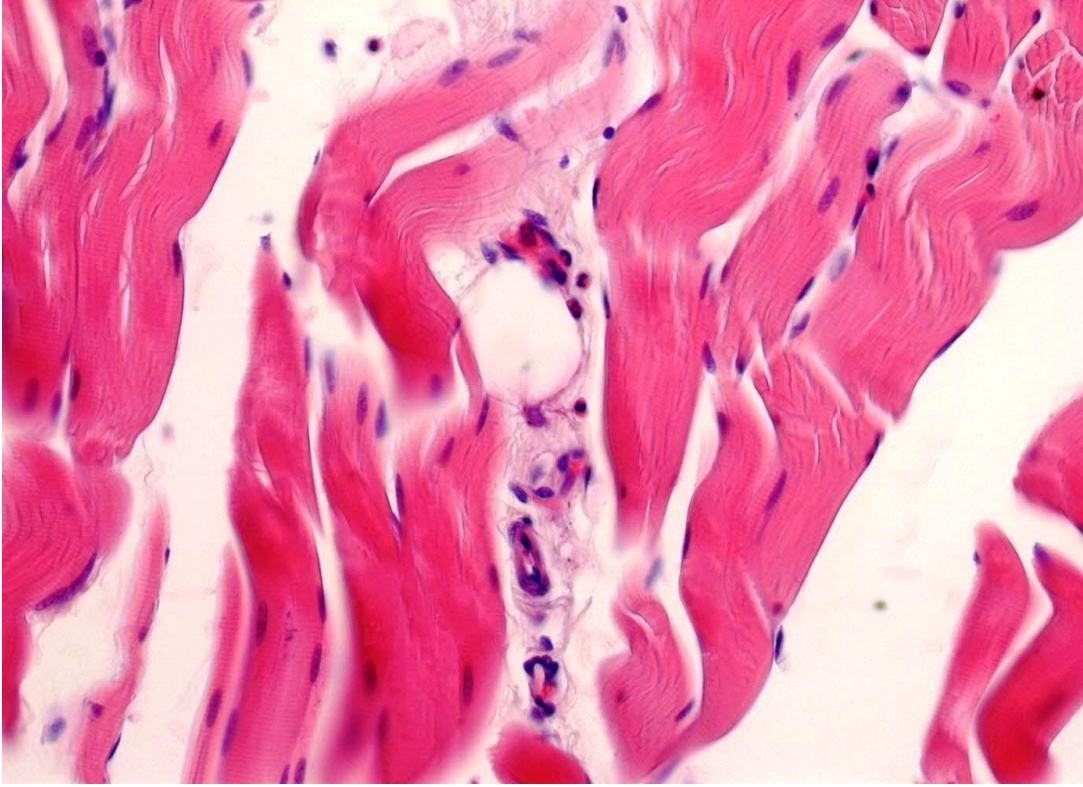
IR grubu ile kontrol grubu ve epidural anestezi grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). IR grubu ve IR+ epidural anestezi grubu arasında SOD değerleri açısından anlamlı fark bulunmadı($p>0.05$)

4.2. HİSTOPATOLOJİK BULGULAR

4.2.1. Hematoksilen Eosin İle Değerlendirme

Hematoksilen eosin ile ışık mikroskopide, tüm grupların femoral arter kesitlerinde histopatolojik bulguya rastlanmadı.

Gastroknemius kas kesitlerinde, IR grubunda 3 olguda postkapiller venüllerde polimorfonükleer lokositlerin damarı doldurduğu ve damar dışına diapedes yaptığı görüldü (resim 5).



Resim 5. IR grubu , PMNL lokositlerin diapedesi (HE X40)

4.2.2. İmmunohistokimyasal Değerlendirme

ICAM1 EKSPRESYONU	Kontrol Grup I (n=9)					İR Grup II (n=9)					İR+ EPİDURAL ANESTEZİ Grup III (n=9)					EPİDURAL ANESTEZİ Grup IV (n=9)					Kruskal Wallis p	Mann Whitney U P<0.05
	-	+	++	+++	ORT	-	+	++	+++	ORT	-	+	++	+++	ORT	-	+	++	+++	ORT		
FEMORAL ARTER ENDOTELİ	9	0	0	0	-	0	0	3	6	+++	0	5	4	0	+	9	0	0	0	-	P < 0.05	I-II I-III II-III II-IV III-IV
GASTROKNEMİUS VASKÜLER ENDOTELİ	9	0	0	0	-	0	0	4	5	+++	0	6	3	0	+	9	0	0	0	-	P < 0.05	I-II I-III II-III II-IV III-IV

Tablo 3: Grupların immunohistokimyasal skorları ve değerlerin gruplar arasındaki istatistiksel analizi.

İmmunohistokimyasal bulguların ortanca skorları; (-) boyama yok, (+) hafif boyama, (++) orta boyama ve (+++) siddetli boyama olarak derecelendirilerek hesaplandı.

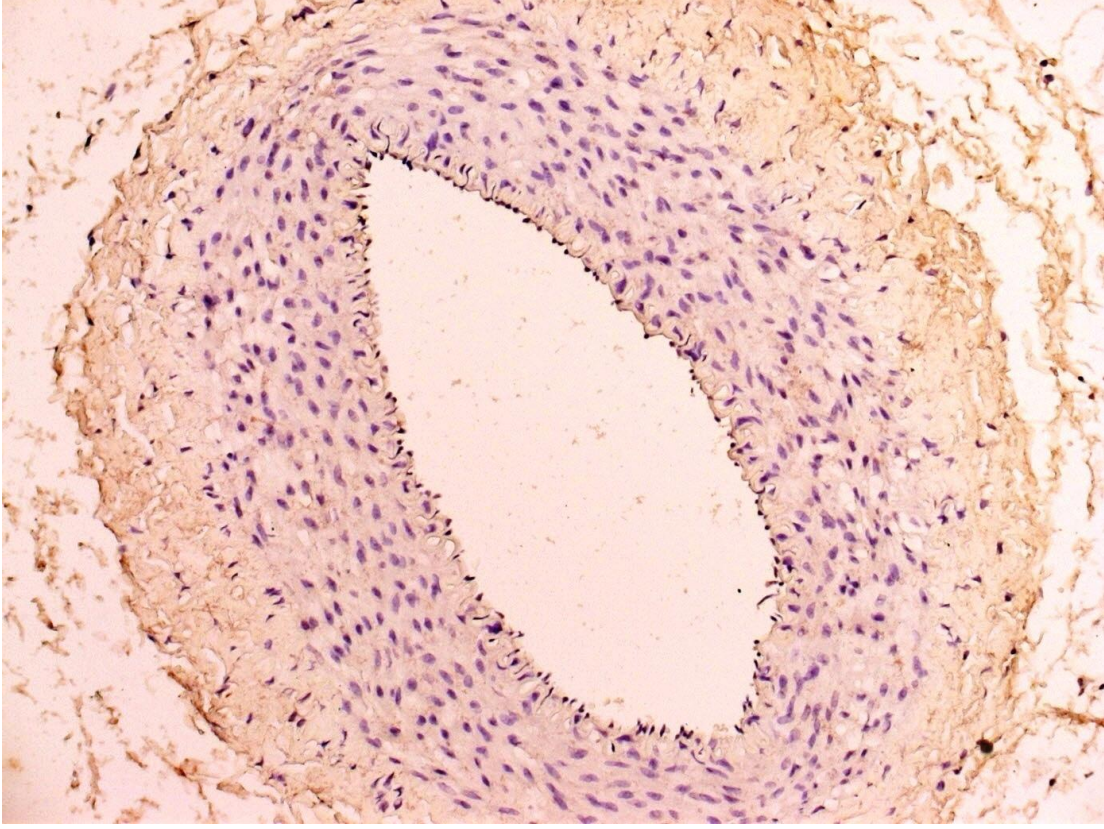
Kontrol grubu ve epidural anestezi grubunda; femoral arter endoteli ve gastroknemius vasküler endoteline ait doku kesitlerinde ICAM-1 immunreaktivitesi görülmedi (Tablo 3, resim 6,7). İR grubunda; femoral arter endoteli ve gastroknemius vasküler endoteline ait doku kesitlerinde immunreaktivitenin şiddetli düzeyde (ortalama skor; +++) olduğu görüldü (Tablo 3, resim 8,9). İR + epidural Anestezi grubunda; femoral arter endoteli ve gastroknemius vasküler endoteline ait doku kesitlerinde immunreaktivitenin hafif düzeyde (ortalama skor; +) olduğu görüldü (Tablo 3, resim 10,11).

Gerek femoral arter endoteli ve gerekse gastroknemius vasküler endoteline ait ortalama skorları alınan immunhistokimyasal bulguların Kruskal-Wallis yöntemiyle istatistiksel analizinde anlamlı farklılık saptandı ($p<0.05$).

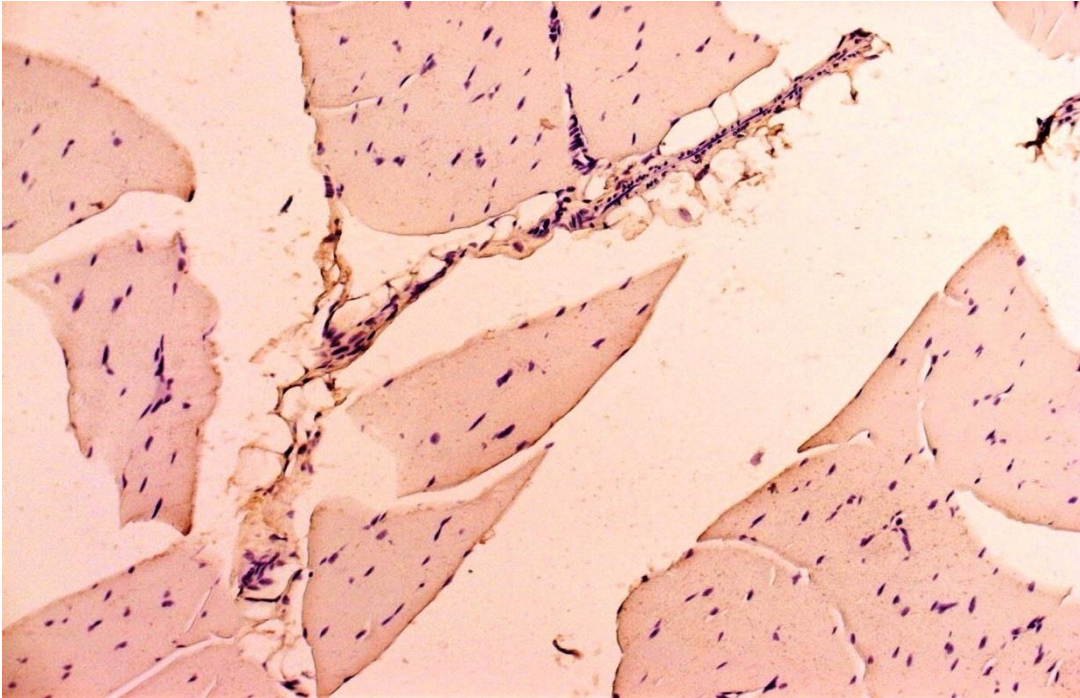
Grupların her birisi kendi arasında karşılaştırılıp değişikliklerin Mann-Whitney U yöntemiyle istatistiksel anlamlılığı incelendiğinde; femoral arter endotelinde ve gastroknemius kas vasküler endotelinde,

ICAM-1 immünoreaktivitesinin; İR ve İR+epidural anestezi gruplarında, kontrol grubuna göre anlamlı düzeyde şiddetli olduğu saptandı ($p<0.05$).

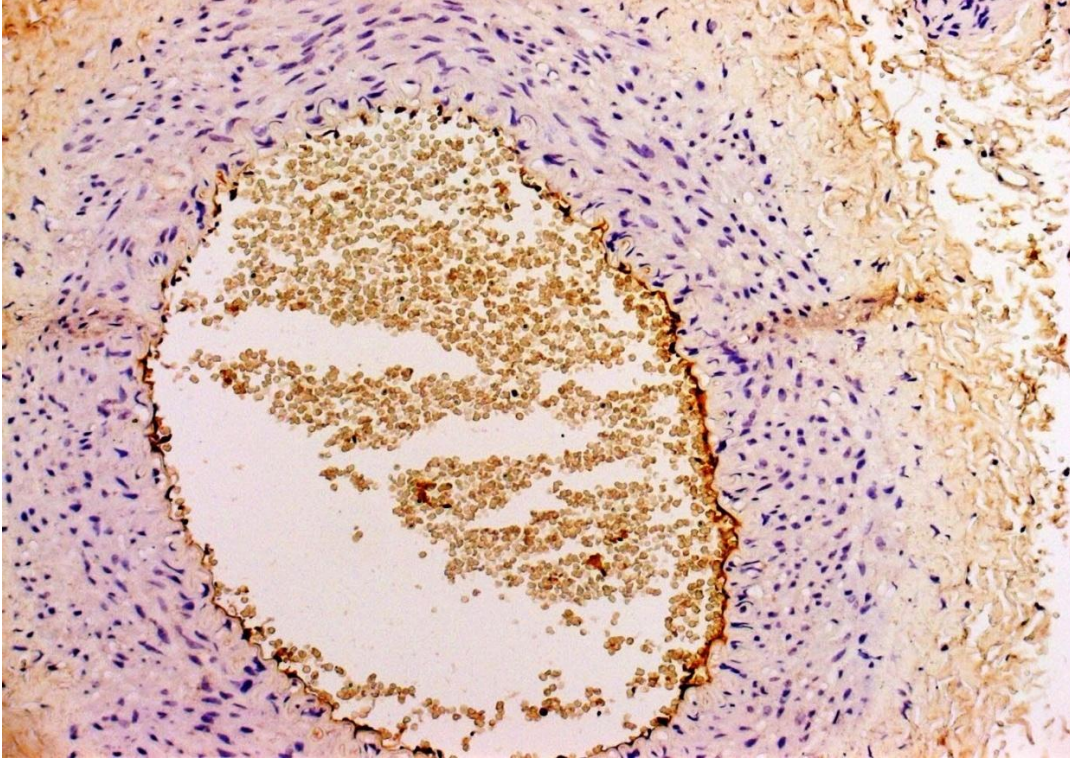
İR + epidural anestezi grubunun ICAM-1 immunreaktivitesinin ise İR grubuna göre, anlamlı derecede hafif olduğu tespit edildi ($p<0.05$).



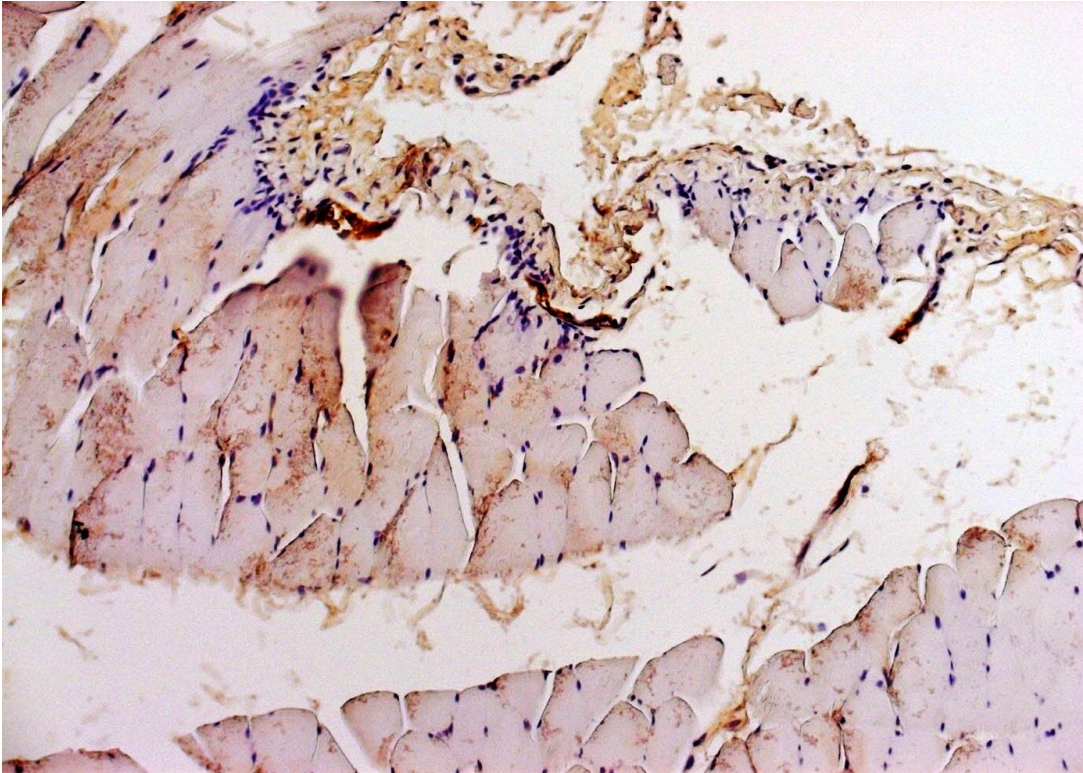
Resim 6. Femoral arter endoteli; kontrol grubu , ICAM-1 immunreaktivitesi gözlenmedi. DABX20



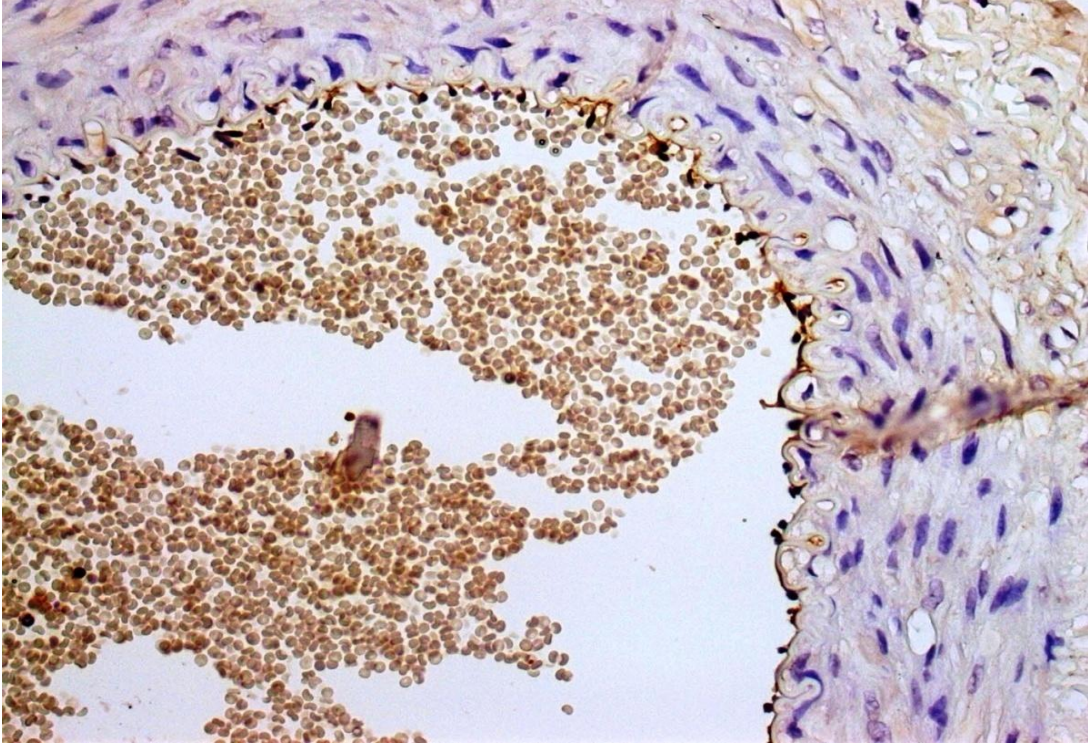
Resim 7. Gastrocnemius kasi; kontrol grubu , ICAM-1 immunreaktivitesi gözlenmedi. DAB X20



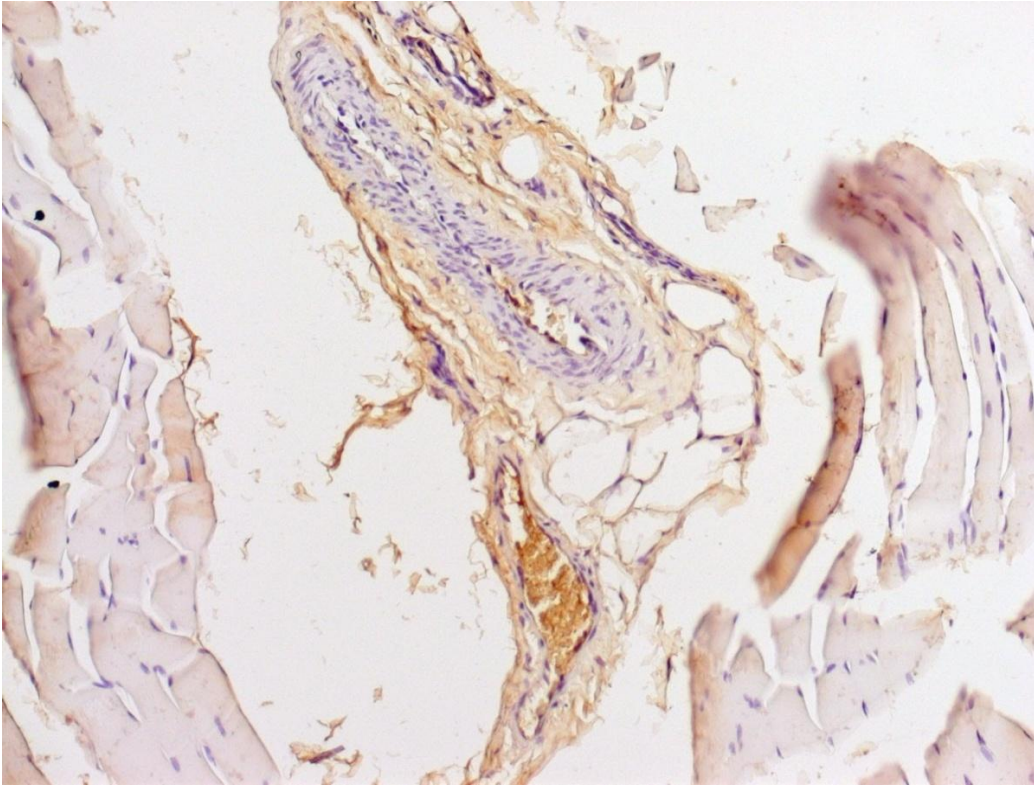
Resim 8. Femoral arter endoteli, IR grubu, şiddetli (+++) ICAM-1 immunreaktivitesi. DABX20



Resim 9. Gastrocnemius kasi, IR grubu, şiddetli (+++) ICAM-1 immunreaktivitesi. DABX20



Resim 10. Femoral arter endoteli, IR+ epidural anestezi grubu, hafif şiddette (+) ICAM -1 immunreaktivitesi. DABX40



Resim 11. Gastrocnemius kas dokusu, IR + epidural anestezi grubu, hafif şiddette (+) ICAM -1 immunreaktivitesi. DABX20

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Akut alt ekstremitte iskemisi çoğunlukla, altta yatan aterosklerotik periferik arter hastalığına bağlı arteriyel tromboz, kardiyak orijinli veya proksimal arteriyel anevrizmadan kaynaklanan arteriyel emboliye bağlı olarak gelişir (1). Arteriyel embolilerin %80'inde kardiyak kaynak söz konusudur (3). Femoro-popliteal bölge, tromboembolilerin en sık gözlenen yerleşim yeridir (7). Sıklıkla alt ekstremitte gelişen akut ekstremitte iskemisinde cerrahi serilerde belirtilen amputasyon ve ölüm oranı sırasıyla %7 ve %10'dur. Genellikle mortalite; altta yatan kardiyak hastalık nedeniyle, embolizasyona bağlı akut alt ekstremitte iskemisi gelişen hastalarda tromboza bağlı olarak gelişenlere göre daha yüksektir (2).

İskelet kası alt ekstremitte iskemiyeye en savunmasız dokudur. Kas dokusu ekstremitenin kültesel olarak en fazla bulunan ve iskemiyeye en duyarlı dokusu olması nedeniyle alt ekstremitenin reperfüzyon sendromunda en kritik dokudur. İskelet kas hasarının iskeminin şiddeti ve süresi ile orantılı olduğu aşikardır. Fizyolojik ve anatomik çalışmalar göstermiştir ki kas hücrelerinde irreversible hasar 3. Saatte başlar ve 6. Saatte neredeyse tamamlanır (12). Alt ekstremitte IR hasarında, lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, kalp, beyin ve böbrekler olmak üzere tüm organlarda gözlenebilir (12). Reperfüzyonla birlikte sistemik dolaşıma çıkan inflamatuvar araçlar, uzak organ endotel hücre aktivasyonu ve mikrovasküler disfonksiyona neden olurlar. IR' a bağlı uzak organ hasarında, ksantin oksidaz, lökosit-endotel etkilesimi ve inflamatuvar araçlar önemli rol oynar. Yaygın uzak organ hasarı durumunda yüksek mortalite ile seyreden multiple organ disfonksiyon sendromu (MODS) veya sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIRS) gelişebilir (14).

Petrasek ve arkadaşları oda sıcaklığında, alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında , iskeminin 4. saatinde kas dokusundaki nekroz oranını %21 , 5.saatte %61 ve 5.saatten sonra %92 olarak bildirmişlerdir (56).

Deneyisel alt ekstremitte iskemi reperfüzyon çalışmalarının çoğunlukla ratlarda yapılmasına rağmen, epidural anestezinin kolay uygulanabilirliği açısından çalışmamızda deney hayvanı olarak tavşan kullanılmıştır.

Tavşanlarda alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına yönelik çalışmalar incelendiğinde , bilateral femoral arter eksplorasyonu ve klemplenmesi ile birlikte kollateral dolaşımı engellemek için turnike uygulanması ve 2.5 h/ 2 h iskemi reperfüzyon süresi (24, 57) tek taraflı inguinal insizyonla femoral arter ve venin birlikte klemplenmesi ile 5 h/ 1 h iskemi reperfüzyon süresi (58), tek taraflı yüksek inguinal insizyonla ana iliak arterin klemplenmesi ve 1h /3 h iskemi reperfüzyon süresi, yine tek taraflı inguinal insizyon ile 1 h / 4 h iskemi reperfüzyon süresi (59) bulunan çalışmalar mevcuttur. Çalışmamızda serbest radikal oluşumunun değerlendirilmesi için MDA değerlerinin IR grubunda doku MDA değerlerinin ölçülecek olması, IR yöntem ve süresini örnek aldığımız çalışmada IR grubunda serum MDA düzeylerinin anlamlı olması, Seekamp ve ark. ratlarda yaptıkları alt ekstremitte iskemi reperfüzyon çalışmasında TNF alfa değerlerinin reperfüzyonun 2. saatinde maksimum değerine ulaştığının bildirilmiş olması nedeniyle (25), Nanobashvili ve ark. nın (24) çalışmalarında uyguladığı femoral arter klemplenmesi ve turnike uygulanması ile 2.5h / 2 h iskemi reperfüzyon süresini çalışmamızda esas aldık ancak iskemi reperfüzyonu tek taraflı uyguladık.

Literatürde epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına etkisini inceleyen bir çalışma bulunmamıştır. Bettsworth ve ark. çocuk ve infantlarda bupivakain ve ropivakain ile kaudal epidural anestezi sonrası non-invasive near-infrared spectroscopy (NIRS) ile üst ve alt ekstremitte doku oksijenizasyonunu değerlendirdikleri çalışmada epidural anestezinin alt ekstremitte doku oksijenizasyonunu artırdığını bildirmişlerdir (60). Treschan ve arkadaşları sağlıklı gönüllülerde yaptıkları çalışmada epidural anestezinin subkutanöz doku oksijenizasyonunu artırdığını bildirmişlerdir (61). Wright ve arkadaşları epidural anestezinin neden olduğu sempatik blokaja bağlı olarak istirahat halindeki alt ekstremitteye giden total kan akımının redistribüsyonu ile cilt kan akımının arttığını ve kas kan akımının azaldığını ; istirahat halindeki kaslarda hatta belki de aktivite sırasında da sempatik sistemin aktif olmadığını, kaslarda kan akımının temel olarak lokal ihtiyaçlara göre düzenlendiğini bildirmişlerdir (62). Haljamäe ve ark. epidural ve genel anesteziyi karşılaştırdıkları ABI <1 olan vasküler cerrahi hastalarında ve ABI> 1 olan nonvasküler cerrahi hastalarında yaptıkları çalışmada epidural anestezinin her iki grupta da bacak total kan akımını artırdığını ve bunun postanestezik periyotta da devam ettiğini, epidural anestezinin genel anestezie göre daha iyi hemodinamik stabilite ve

daha fazla alt ekstremitte kan akımı sağlması nedeniyle arteriyel rekonstrüksiyon yapılan hastalarda genel anesteziye göre avantajlı olduğunu bildirmişlerdir (63).

İskemi reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikallerinin aşırı üretimine neden olur ve bu durum endojen antioksidanların tüketimine ve azalmasına neden olur. Aşırı miktarda serbest oksijen radikali membran fosfolipidlerine saldırarak zincirleme lipid peroksidasyonuna neden olurlar, ilk olarak endotelial hücrelerde, hücrelerin sarkolemmal bütünlüğünü bozarlar. İn vivo olarak serbest oksijen radikallerinin direkt ölçümü zordur çünkü yüksek derecede reaktifdirler ve kısa yarı ömre sahiptirler. Serbest oksijen radikallerinin poliansatüre lipidlere hasarı sonucu oluşan, daha elverişli ve daha stabil bir ürün olan lipid peroksidasyon ürünü malondialdehit (MDA) ölçülebilir (16 , 24). Çalışmamızda IR ve IR+ epidural anestezi grubunda kas dokusunda MDA değerleri kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulunmuştur. IR+epidural anestezi grubunda MDA değerleri IR grubuna göre anlamlı düşük bulunmuştur. Bu bulgular, epidural anestezinin, alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunu azalttığını düşündürmektedir. Benzer şekilde Yüceyar ve ark.nın aortofemoral bypass uygulanan hastalarda genel anestezi ile epidural anestezinin karşılaştırıldığı çalışmasında epidural anestezinin revaskülarizasyon sonrası dönemde lipid peroksidasyonunu azalttığını bulmuşlar ancak antioksidan enzimlerde anlamlı fark bulamamışlardır (50).

Serbest oksijen radikalleri hücre ve organellerin membranlarındaki lipidlerin peroksidasyonu, protein denatürasyonu ve DNA hasarı yoluyla hücrede hasara neden olur. Reperfüzyon; iskemi tarafından oluşturulan hasarı, O_2^- , OH^- ve H_2O_2 aracılığıyla daha da artırır ve bu hasar genellikle iskemik hasardan daha yıkıcıdır (14). Aerobik canlılarda süperoksitlerin H_2O_2 'ye çevrilmesi katalitik aktivitesi çok yüksek bir enzim olan süperoksit dismutaz tarafından katalizlenir ve bu reaksiyon 'dismutasyon tepkimesi' olarak adlandırılır (17). SOD'ın memelilerde farklı genler tarafından kodlanan ancak benzer reaksiyonları katalizleyen üç izoformu mevcuttur. Sitozolik (CuZn-SOD veya SOD-1), mitekondride bulunan Mn-SOD veya SOD-2 ve ekstrasellüler form olan CuZn-SOD (EC-SOD veya SOD-3) (23). Çalışmamızda IR grubunda kas SOD düzeyleri kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuştur. IR grubunda artmış SOD düzeyleri, serbest oksijen radikallerine karşı hücresel düzeyde cevabın göstergesi olarak değerlendirilmiştir. Ancak

IR + epidural grubu ile IR grubu arasında SOD düzeyleri bakımından anlamlı farklılık bulunmamıştır.

Sitokinler arasında TNF- α ve IL-1, inflamatuvar doku hasarı için invitro ve hayvan modellerinde en çok çalışılan sitokinlerdir. TNF- α vasküler permeabilitenin nötrofil bağımlı ve bağımsız mekanizmalarla artmasına aracılık eder. Oksijen radikallerinin de TNF- α aracılı hasarda yer aldıkları gösterilmiştir (25). TNF- α ve IL-1 β sistemik inflamatuvar yanıt sendromunun primer mediatörleri iken (64, 65), IL-6 ise akut faz protein yanıtının sekonder mediatörüdür (66, 67). Çalışmamızda, TNF- α ve IL-6 değerleri 2 saatlik reperfüzyon sonrasında IR grubunda kontrol grubuna göre anlamlı yüksek bulunmuş, ancak IR grubu ile IR+ epidural anestezi grubu arasında anlamlı farklılık bulunamamıştır. Seekamp ve ark. ratlarda yaptıkları alt ekstremitte iskemi reperfüzyon çalışmasında TNF alfa değerlerinin reperfüzyonun 2. saatinde maksimum değerine ulaştığı, IL -6 değerlerinin de reperfüzyonun süresince artarak 4. saatte ölçülen değerlerin en yüksek seviyede olduğu gözlenmiştir(25). Yassin ve ark. nın ratlarda yaptığı çalışmada 3 saatlik iskemi sonrasında, TNF- α değerlerinin kontrol değerlerine yakın olduğu, reperfüzyonun 1. saatinde istatistiksel olarak anlamlı yükseliş gözlendiği, ancak reperfüzyonun 2. saatinde kontrol değerlerine döndüğü bildirilmiştir. IL-6 değerlerinin de reperfüzyonda progresif ve 1. saatinde anlamlı olarak arttığı ve 3. Saatteki ölçümde maksimum değer elde edildiği bildirilmiştir (27).

ICAM immunglobulin superailisinin bir üyesidir. Lokositlerin doku hasarı bölgesinde lokalize olmasını sağlarlar. Birçok sitokin, interferon δ , IL-1 ve TNF- α endotel hücre yüzeyinde ICAM oluşumunu indükler. ICAM-1 sitokinle uyarılmış hücre yüzeylerinde (endotel, lokosit, dermal fibroblastlar, melanositler) ve bazı karsinomlarda oluşur. ICAM-2 nötrofillerin doku hasarı bölgesine ilk lokalizasyonunda önemli rol oynar. ICAM-3 lokositlerde yapısal olarak bulunur ve CD 11a/CD 18 için ligandır. ICAM-3 monosit /makrofaj ve β hücrelerde fazla bulunur (28). Lokosit adezyon ve transmigrasyonu yapısal olarak ICAM-1 ekspresyonu tarafından düzenlenir ve reperfüzyon sonrasında artar (29). Çalışmamızda kas dokusu ve femoral arter endotelinde immunhistokimyasal olarak ICAM-1 ekspresyonu değerlendirildiğinde, IR grubunda ICAM-1 ekspresyonunda kontrol grubuna göre anlamlı artış ve IR+ epidural anestezi grubunda IR grubuna göre anlamlı azalma gözlenmiştir. Huda ve ark. diz cerrahisinde hemostaz amacıyla konulan turnikeye

sekonder gelişen iskelet kası IR hasarında ICAM-1 mRNA ifadesinin kontrol grubuna göre arttığını bildirmişlerdir (68). Mickley ve ark. tarafından yapılan AAA anevrizmasının cerrahi ve endovasküler tamir yönteminin karşılaştırıldığı çalışmada her iki grupta da plazma ICAM-1 düzeylerinde artış saptanmış, ancak cerrahi grupta artışın daha yüksek olduğu bildirilmiştir (69). Bedirli ve ark. ratlarda epidural bupivakainin mezenterik IR modelinde ICAM-1 ekspresyonunu anlamlı olarak azalttığını bildirmişlerdir. Yine bu çalışmada, TNF- α , IL-1 β , IL-6, MPO, MDA, GPX, CAT, SOD değerleri epidural anestezi grubunda daha düşük olarak bulunmuş, epidural anestezinin mezenterik iskemi reperfüzyon hasarında intestinal hasarı ve sistemik inflamatuvar yanıtı azalttığı bildirilmiştir (70).

Sonuç olarak çalışmamızda elde edilen bulgular, epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunu azalttığını ve immunhistokimyasal olarak lokal inflamatuvar yanıtın azalmasına yardımcı olduğunu göstermektedir. Bu veriler göz önüne alınarak epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada olumlu etkileri bulunduğu düşünülebilir. Ancak daha ayrıntılı deneysel ve klinik çalışmalara ihtiyaç vardır.

6. ÖZET

Epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyon hasarına etkileri

Amaç: Sıklıkla kardiyak kökenli trombüs, altta yatan periferik arter hastalığına bağlı akut arteriyel tromboz ve proksimal arteriyel anevrizmadan kaynaklanan embolilere bağlı gelişen ve vasküler cerrahi vakalarının önemli bir bölümünü oluşturan akut alt ekstremitte ciddi morbidite ve mortaliteye neden olur. Epidural anestezinin alt ekstremitte dolaşımı üzerine olumlu etkileri olduğu bilinmektedir. Bu çalışmada, epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyon (İR) hasarı üzerine etkilerini araştırmak amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: Otuzaltı adet Yeni Zelanda tipi erkek tavşan, rastgele 4 eşit gruba ayrıldı. Grup I sham grubu, Grup II İR grubu, Grup III İR + epidural tedavi grubu, Grup IV ise epidural kontrol grubu olarak belirlendi. İR modeli, sağ alt ekstremitte femoral arter eksplorasyonu ve inguinal ligaman altından ana femoral arterin klemplenmesi + turnike uygulanması ile 150 dakika iskemi, 120 dakika reperfüzyon ile sağlandı. Epidural kateter kaudal yöntemle L1-L2 seviyesine gelecek şekilde yerleştirildi. Epidural lidokain, bolus dozu takiben toplam İR süresi olan 270 dakika (150 dakika iskemi + 120 dk reperfüzyon) boyunca infüzyon şeklinde verildi. Toplam İR süresi sonunda interlökin-6 (IL-6), tümör nekroz faktör- α (TNF- α) ölçümü için kan, malondialdehit (MDA), süperoksit dismutaz (SOD) ölçümü için gastroknemius kas , immunohistokimyasal değerlendirme için femoral arter ve gastroknemius kas örnekleri alındı.

Bulgular: İR grubunda diğer gruplarla karşılaştırıldığında, kas MDA düzeyleri, istatistiksel olarak anlamlı yüksek bulundu ($p<0.05$). İR grubu sham grubu ile karşılaştırıldığında, serum TNF- α ve IL-6, kas SOD değerleri arasında istatistiksel anlamlı fark bulundu ($p<0.05$). İR + epidural grubu, İR grubu ile karşılaştırıldığında, serum TNF- α ve IL-6, kas SOD değerleri arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı ($p>0.05$). Epidural kontrol grubu ile sham grup karşılaştırıldığında ölçülen tüm biyokimyasal değerler arasında istatistiksel olarak anlamlı fark bulunamadı ($p>0.05$). Femoral arter endoteli ve gastroknemius kas dokusunda ICAM-1 ekspresyonu İR + epidural tedavi grubunda İR grubuna göre anlamlı olarak düşüktü ($p<0.05$).

Sonuç: Bu deneysel çalışmanın sonucunda, epidural anestezinin akut alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunu azaltmada olumlu etkileri bulunduğu söylenebilir.

Anahtar kelimeler: epidural anestezi; iskemi reperfüzyon hasarı; alt ekstremitte.

7. ABSTRACT

The effects of epidural anesthesia on acute limb ischemia reperfusion injury in the rabbit model

Background : Acute lower extremity ischemia usually develops from cardiac originated thrombus, underlying peripheral artery disease related arterial thrombus and emboli that sourced from proximal arterial aneurysm. It is the important part of the vascular surgery cases and it causes serious morbidity and mortality. It is known that epidural anesthesia has positive effects on lower extremity circulation. In this study, it was aimed to investigate the effects of epidural anesthesia on acute lower extremity ischemia reperfusion damage.

Material and Method: Thirty six male New Zeland rabbits were randomized into four groups either as sham (n=9, Group I), IR (n=9, Group II), IR + epidural treatment (n=9, Group III) group and epidural treatment control (n=9, Group IV). IR model was exposed to 150 minutes of ischemia and 120 minutes reperfusion by right lower extremity femoral artery exploration and main femoral artery clamping under inguinal ligament and with tourniquet. Epidural catheter was placed in the level of L1-L2 via caudal method. Epidural lidocain was given a bolus dose, followed by continuous infusion throughout the total IR period. At the end of the total IR period, blood sampling for measurement of interleukin 6 (IL-6), tumor necrosis factor- α (TNF- α), gastrocnemius muscle sampling for measurement of malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and femoral artery and gastrocnemius muscle sampling for histopathological examination were performed.

Results: Compared with the other groups, muscle MDA levels were higher in IR group and it was statistically significant ($p < 0.05$). IR group compared with sham group, in IR group there were statistically significant differences in the levels of TNF- α , IL-6 and muscle SOD ($p < 0.05$). Compared with IR group there were no statistically significant differences in TNF- α , IL-6 and muscle SOD values in IR + epidural group was found ($p > 0.05$). In the comparison of epidural control group and sham group, there were no differences was found with in the all biochemical value measurements ($p > 0.05$). ICAM-1 expression in

femoral artery endothel and gastrocnemius muscle tissue was lower in IR + epidural treatment group compared with IR group, which was statistically significant ($p < 0.05$).

Conclusion: As a result of this experimental study, it could be said that epidural anesthesia reduce the acute lower extremity ischemic reperfusion damage.

Keywords: anesthesia; epidural; ischemia reperfusion injury; limb

8. KAYNAKLAR

- 1- Jaffery Z, Thornton SN, White CJ. Acute limb ischemia The American Journal of the Medical Sciences 2011;342(3): 226–34.
- 2- Laird JR. The Management of Acute Limb Ischemia: Techniques for Dealing with Thrombus. Journal of Interventional Cardiology 2001;14: 539-46.
- 3- Baxter-Smith D, Ashton F, Slaney G. Peripheral arterial embolism. A 20 year review. J Cardiovasc Surg 1988;29: 453-7.
- 4- Greenberg RK, Ouriel K. Arterial thromboembolism. In: Rutherford RB, Cronenwett JL, Glovicky P, Johnston KW, Kempczinski RF, Krupski WC, editors. Vascular surgery. 5th ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2000. p. 822-35.
- 5- Perier P, Bessou JP, Swanson JS, et al. Comparative evaluation of aortic valve replacement with Star, Björk and porcine valve prostheses. Circulation, 1985: 72;140-5.
- 6- Costantini V, Lenti M. Treatment of acute occlusion of peripheral arteries. Thrombosis Research 2002;106(6) : V285–94
- 7- Haimovici H. Arterial embolism of extremities and technique of embolectomy. In: Haimovici H, Ascer E, Hollier LH, editors. Vascular surgery. 4th ed. Massachusetts: Blackwell Science; 1996. p. 423-44.
- 8- Rutherford RB, Baker JD, Ernst C, et al. Recommended standards for reports dealing with lower extremity ischemia: revised version. J Vasc Surg 1997;26(3): 517–38
- 9- Kumar V, Abbas K. A, Fausto N, Mitchel NR , Temel Patoloji 8. Basım ; 18 Yüce Yayınları
- 10- Mangino MJ, Anderson CB, Murphy MK, et al. Mucosal arachidonate metabolism and intestinal ischemia–reperfusion injury. 1989; Am J Physiol: 257: G299–307
- 11- Xu Y, Huo Y, Toufektsian MC, Ramos SI, Ma Y, Tejani AD, French BA, Yang Z. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2006;290(2): H692-9

- 12- Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg.* 2002; 10(6): 620-30
- 13- Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM. The effect of ischemia/reperfusion on adenine nucleotide metabolism and xanthine oxidase production in skeletal muscle. *J Vasc Surg*, 1990; 12(1): 8–15.
- 14- Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. *J Pathol*, 2000; 190(3):255-66.
- 15- Şener G. Yeğen BÇ. İskemi reperfüzyon hasarı. *Klinik Gelişim Dergisi* 2009;22(3):5-13
- 16- Maxwell SR, Lip GY. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options *Int J Cardiol.* 1997 Jan 31;58(2):95-117.
- 17- Kılınç A. Kılınç K. Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33(2): 110 – 118
- 18- Dormandy TI. An approach to free radicals. *Lancet.* 1983 Oct 29;2(8357):1010-4.
- 19- Akkuş İ. Serbest Radikaller ve Fizyopatolojik Etkileri. Konya: Mimoza Yayınları,1995:1-80.
- 20- Eltzhig H.K, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin* 2004; 70: 71–86
- 21- Korthuis RJ, Gute DC. Adhesion Molecule Expression in Postischemic Microvascular Dysfunction: Activity of a Micronized Purified Flavonoid Fraction *J Vasc Res* 1999;36(suppl 1):15–23
- 22- Fukai T, Ushio-Fukai M. Superoxide Dismutases: Role in Redox Signaling, Vascular Function, and Diseases. *Antioxid Redox Signal.* 2011 Sep 15;15(6):1583-606.
- 23- Faraci FM, Didion SP. Superoxide Dismutase Isoforms in the Vessel Wall *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2004 Aug;24(8):1367-73.

- 24- Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, Punz A, Blumer R. et.al. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle J Vasc Surg. 2004 ;39(4):868-77.
- 25- Seekamp A, Warren JS, Remick DG, Till GO, Ward PA. Requirements for Tumor Necrosis Factor- α and Interleukin-1 in Limb Ischemia/Reperfusion Injury and Associated Lung Injury Am J Pathol. 1993 ;143(2):453-63.
- 26- Gaines GC, Welborn MB 3rd, Moldawer LL, Huber TS, Harward TR, Seeger JM. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor J Vasc Surg. 1999 ;29(2):370-6.
- 27- Yassin MM, Harkin DW, Barros D'Sa AA, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower Limb Ischemia-Reperfusion Injury Triggers a Systemic Inflammatory Response and Multiple Organ Dysfunction World J Surg. 2002 ;26(1):115-21
- 28- Elangbam CS, Qualls CW Jr, Dahlgren RR. Cell adhesion molecules--update. Vet Pathol. 1997;34(1):61-73.
- 29- Anderson S.I, Shiner R, Brown M.D, Hudlicka O. ICAM-1 expression and leukocyte behavior in the microcirculation of chronically ischemic rat skeletal muscles. Microvasc Res. 2006;71(3):205-11
- 30- Perry MA, Granger DN. Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocytes-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules. J Clin Invest. 1991;87(5):1798-804
- 31- Jerome SN, Doré M, Paulson JC, Smith CW, Korthuis RJ. P-selectin and ICAM-1-dependent adherence reactions: role in the genesis of postischemic no-reflow. Am J Physiol. 1994 Apr;266(4 Pt 2):H1316-21.
- 32- Merchant SH, Gurule DM, Larson RS. Amelioration of ischemia-reperfusion injury with cyclic peptide blockade of ICAM-1. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2003 Apr;284(4):H1260-8
- 33- Kayhan Zeynep: Klinik Anestezi 3. baskı Logos yayıncılık 2004; 552-589

- 34- Erdine S, Özyalçın SN, Raj PP, Heavner J, Aldemir T, Yücel A. Rejyonel Anestezi. Nobel Tıp Kitabevleri, 2005:135–158.
- 35- Brown DL; Spinal, Epidural and Caudal Anesthesia: IN:Miller RD (ed), Anesthesia.5 thEd, USA, Churchill Livinstone Inc 2005, Chapter 43, 1653-83
- 36- Atkinson RS, Rushman GB, Alfedlee J: A synopsis of anaesthesia, 9th. Ed. Wright,Bristol. 1982; 758.
- 37- Morgan GE, Jr Maged SM: Clinical Anesthesiology, 2nd Ed. Appleton Lange, USA. 1996; 200–211.
- 38- Bonica JJ, Berges PU, Morikawa K. Circulatory affects of peridural block: effect of levels of analgesia and dose of lidocain. Anesthesiology. 1970 ;33(6):619-26.
- 39- Bonica JC: The management of pain. 2nd. Edition. Lea and Febriger. Philadelphia. 1990; 1878–1883.
- 40- Whitehaus RH, Grave AJ. The Dissection of the rabbit with an appendix on the rat. London.University Tutarial Pres Ltd.1976;32-42
- 41- Barone R, Pavaux C, Blin PC, Cuq P:Atlas D’Anatomie du Lapin (Atlas of Rabbit Anatomy), Mason and Editeurs 1973, 156-170
- 42- H. Haljamae Anaesthesia for vascular surgery of the lower limb Current Anaesthesia and Critical Care 1999 ;10: 192- 97
- 43- Tuman K J, McCarthy R J, March R J et al. Effects of epidural analgesia on coagulation and outcome after major vascular surgery. Anesth Analg 1991 ; 73(6): 696-704.
- 44- Christopherson R, Beattie C, Frank SM, Norris EJ, Meinert CL. et al. Perioperative morbidity in patients randomized to epidural or general anesthesia for lower extremity vascular surgery. Anesthesiology 1993;79(3):422-34.
- 45- Perler BA, Christopherson R, Rosenfeld BA, Norris EJ, Frank S, Beattie C, et al. The influence of anesthetic method on infrainguinal bypass graft patency: a closer look. Am Surg 1995;61:784-9

- 46- Rosenfeld BA, Beattie C, Christopherson R, Norris EJ, Frank SM, Breslow MJ, et al. The effects of different anesthetics on fibrinolysis and the development of postoperative arterial thrombosis. *Anesthesiology* 1993;79:435-43.
- 47- Parker SD, Breslow MJ, Frank SM, Rosenfeld BA, Norris EJ, Christopherson R, et al. Catecholamine and cortisol responses to lower extremity revascularization: correlation with outcome variables. Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group. *Crit Care Med* 1995;23:1954-61.
- 48- Modig J, Malmberg P, Karlström G. Effect of epidural versus general anesthesia on calf blood flow. *Acta Anaesthesiol Scand* 1980;24:305-9.
- 49- Hickey NC, Wilkes MP, Howes D, Watt J, Shearman CP. The effect of epidural anesthesia on peripheral resistance and graft flow following femorodistal reconstruction *Eur J. Vasc Endovasc Surg* 1995 Jan;9(1):93-6
- 50- Yuceyar L, Erolcay H, Konukoglu D, Bozkurt AK. Epidural anesthesia may attenuate lipid peroxidation during aortofemoral surgery *Can J. Anesth.* 2004 ;51(5): 465-71
- 51- Thomson PD, Melmon KL, Richardson JA, Cohn K. Lidocaine pharmacokinetics in advanced heart failure, liver disease, and renal failure in humans. *Ann. Intern Med.* 1973; 78: 499–508
- 52- Kayaalp S, Oğuz Rasyonel Tedavi Yönünden Tıbbi Farmakoloji 10. Baskı, Hacettepe Taş, 2002:510, 802-803
- 53- Durak I, Canbolat O, Kavutcu M, Öztürk HS, Yurtarslani Z. Activities of total, cytoplasmic and mitochondrial superoxide dismutase enzymes in sera and pleural fluids from patients with lung cancer. *J Clin Lab Anal.* 1996; 10: 17-20.
- 54- Dahle LK, Hill EG, Hollman RT. The thiobarbituric acid reaction and the autoxidations of polyunsaturated fatty acid methyl esters. *Arch Biochem Biophys.* 1962; 98: 253-61.
- 55- Khandoga A, Enders G, Biberthaler P, Krombach F. Poly(ADP-ribose) polymerase triggers the microvascular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 2002;283:553-60

- 56- Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM. Determinants of ischemic injury to skeletal muscle. *J Vasc Surg.* 1994 Apr;19(4):623-31.
- 57- Nanobashvili J, Neumayer C, Fügl A, Punz A, Blumer R. et al. Ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle: Plasma taurine as a measure of tissue damage. *Surgery.* 2003 ; 133(1):91-100.
- 58- Wei X, Zhang Z, Han L, Wei Y. Protective effect of anisodamine on reperfusion injury of skeletal muscles in rabbit *Acta Orthop Scand.* 1998;69(6):633-7.
- 59- Yasa H, Yakut N, Emrecan B, Ergunes K, Ortac R et. al. Protective Effects of Levosimendan and Iloprost on Lung Injury Induced by Limb Ischemia-Reperfusion: A Rabbit Model *J Surg Res.* 2008 ;147(1):138-42.
- 60-Bettesworth J, Bhalla T, Barry N, Tobias JD. Changes in tissue oxygenation following caudal epidural blockade in infants and children. *Pediatric Anesthesia* 22 (2012) 1068–1071
- 61- Treschan TA, Taguchi A, Ali SZ et al. The effects of epidural and general anesthesia on tissue oxygenation. *Anesth Analg* 2003; 96:1553- 7.
- 62- C. J. Wright, M. J. Cousins Blood Flow Distribution in the Human Leg Following Epidural Sympathetic Blockade *Arch Surg.* 1972;105(2):334-337.
- 63- Haljamäe H, Frid I, Holm J, Akerström G. Epidural vs general anaesthesia and leg blood flow in patients with occlusive atherosclerotic disease. *Eur J Vasc Surg.* 1988 ;2(6):395-400.
- 64- Fahey TJ 3rd, Yoshioka T, Shires GT, Fantini GA: The role of tumor necrosis factor and nitric oxide in the acute cardiovascular response to endotoxin *Ann. Surg.* 1996;223:63–9
- 65- Welbourn R, Goldman G, O’Riordain M, Lindsay TF, Paterson IS, Kobzik L, Valeri CR, Shepro D, Hechtman HB. Role for tumor necrosis factor as mediator of lung injury following lower torso ischemia. *J. Appl. Physiol.* 1991;70:2645–9

66- Kowal-Vern A, Walenga JM, Hoppensteadt D, Sharp-Pucci M, Gamelli RL. Interleukin-2 and interleukin-6 in relation to burn wound size in the acute phase of thermal injury. *J. Am. Coll. Surg.* 1994;178:357–62

67- Roumen RM, Hendriks T, van der Ven-Jongekrijg J, Nieuwenhuijzen GA, Sauerwein RW. et. al. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma. Relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Ann. Surg.* 1993;218:769–776

68- Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci (Lond).* 2004;107(5):497-503.

69 -Mickley V, Gallmeier U, Galster A, Scharrer-Pamler R, Bruckner UB, Sunder-Plassmann L. Monitoring ischemia-/reperfusion syndrome in abdominal aortic aneurysm-conventional operation versus stent implantation] *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998;115(Suppl I):7-11.

70- Bedirli N, Akyurek N, Kurtipek O, Kavutcu M, et al Thoracic epidural bupivacaine attenuates inflammatory response, intestinal lipid peroxidation, oxidative injury, and mucosal apoptosis induced by mesenteric ischemia/reperfusion. *Anesth Analg.* 2011;113:1226-32

9. TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimim boyunca yetişmemde ve meslek sahibi olmamda büyük emekleri geçen sayın Prof. Dr. Hasan SOLAK, Prof. Dr. Tahir YÜKSEK, Prof. Dr. Cevat ÖZPINAR, Prof. Dr. Mehmet YENİTERZİ, Prof. Dr. Ali SARIGÜL, Prof. Dr. Kadir DURGUT, Prof. Dr. Erdal EGE, Prof. Dr. Niyazi GÖRMÜŞ, Doç. Dr. Ahmet ÖZKARA ve Doç. Dr. Cüneyt NARİN'e, asistanlığım sırasında bilgi ve birikimlerini aktararak cerrahi gelişimimde katkı sağlayan kıdemlilerime, bir ekip ruhu içerisinde özveri ile beraber çalıştığımız asistan arkadaşlarıma ve diğer tüm klinik çalışanlarına teşekkür ederim.

Tezimin gerçekleşmesi sırasında yardımlarından dolayı tez danışmanım Prof. Dr. Erdal EGE'ye , histopatolojik değerlendirmeler için Doç. Dr. Füsün BABA'ya, biyokimyasal değerlendirmeler için Yrd. Doç. Dr. Bahadır ÖZTÜRK'e, istatistiksel değerlendirmeler için Prof. Dr. Tahir Kemal ŞAHİN'e teşekkür ederim.

İyi bir insan ve cerrah olmam için maddi, manevi desteklerini esirgemeyen, her zaman yanımda olan aileme, teşekkürü bir borç bilirim.

Dr. Gürhan HACİBEYOĞLU
Konya - 2012