

33164

T.C.

Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi
Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi
Anabilim Dalı

İNTRAVİTAL MİKROSKOBİDE MODİFİYE BİR MODEL:
İZOLE KREMASTER KAS ADA FLEBİNDE DEĞİŞİK
PERFÜZYON SOLÜSYONLARININ İSKEMİ REPERFÜZYON
HASARINA ETKİSİ

(Uzmanlık Tezi)

Dr.Mehmet Alper

BORNOVA-1993

İÇİNDEKİLER

Özet.....	2
Giriş.....	4
Materyel ve Metot.....	13
Bulgular.....	21
Tartışma.....	28
Kaynaklar.....	33

ÖZET

İskemi-reperfüzyon hasarı; plastik ve rekonstrüktif cerrahinin son 10-15 yılda üzerinde yoğun çalışmalar yapılarak tartışılmış, çözümünde epey yol alınmış ancak halen tam olarak çözülememiş bir konudur. Bu konu aslında sadece plastik cerrahiye değil mikrocerrahi ile uğraşı veren tüm klinikleri yakından ilgilendirmektedir.

Yapılan çalışmalarda kullanılan modeller kalp, ince barsaklar, pankreas, böbrek, karaciğer gibi viseral organlar dışında deri ve kas dokusunun ne denli etkilendiğini bulmaya yöneliktir. Özellikle iskelet kasında reperfüzyon hasarının fizyopatolojisi açık bir şekilde gösterilememiştir.

Bu çalışmanın amaçları şunlardır:

- İzole kremaster kasının kullanılması ile klinik tablonun simülasyonu (taklidi).
- Flep pedikülünün indirekt kanülasyonu ile kasın perfüze ve drene edilmesi.
- Reperfüzyon hasarında değişik perfüzyon solüsyonlarının mikrosirkülasyona etkisinin tayini.
- Reperfüzyon hasarının fizyopatolojisinin daha iyi anlaşılması.

Bu amaçlar ışığında; 22 sıçanda aortadan başlayıp femoral arter ve ven mikrokanüllerle kanüle edilmek üzere korunarak izole kremaster kas ada flebi oluşturuldu. 2 kontrol grubundan 1'i ve 2 deney grubunda iliak pedikül klempe edilip 2 saatlik iskemi uygulandı. Klemp konduktan hemen sonra deney gruplarının birinde Laktatlı Ringer diğeri ise "University of Wisconsin" solüsyonu femoral arterden verilip venden alınmak suretiyle kas lokal olarak perfüze edildi ve bu solüsyonlarla yıkanmış oldu. Preiskemik ve

postiskemik arteriol ve venül çapları, doku kan akımı, kapiller dansite, eritrosit hızları ve lökosit yapışmaları ölçülerek kullanılan solüsyonların reperfüzyon hasarına etkisi mikrosirkülatuar düzeyde ortaya kondu.



GİRİŞ

Bir doku iskemiyeye uğradığında bir seri kimyasal reaksiyonlar başlar ki bu da sonunda hücre sel disfonksiyona ve nekroza yol açar. İskemi sonucu oluşan böyle bir durumun nedeni tek bir reaksiyon ve olayla açıklanamamakla beraber, enerji depolarının tükenmesi ve toksik metabolitlerin birikmesinin hücre ölümüne yol açtığı bilinmektedir. Dolaşımın durduğu iskemik dokularda hücrelerin beslenebilmesi ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılabilmesi için kan akımının tekrar sağlanması gerekir. Bununla beraber iskemik dokuların reperfüzyonu paradoksik olarak yarar yerine zarar vermektedir. Serbest doku transferi, transplantasyon ve replantasyon cerrahisinde dolaşım başladığında bazen, akım giderek azalmakta endotelial permeabilite artmakta ve nekroz gelişmektedir. Bu fenomene "iskemi-reperfüzyon hasarı" denir[9, 18, 20, 28, 29, 30, 33, 40, 54, 60, 74, 76, 86, 87].

İskemi-reperfüzyon hasarında reaktif O₂ metabolitlerinin (ROM) rolü:

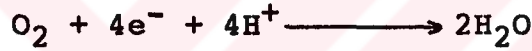
Reperfüzyon hasarından sorumlu ana etken serbest radikallerdir. Serbest radikal, dış yörüngesinde çiftleşmemiş (doymamış) yani serbest bir elektron içeren atom veya moleküle verilen isimdir. Bu durumları nedeniyle kendilerine özgü fizik ve kimyasal özellikleri vardır. Bunlar özetle;

- Birçok forma girebilir ve dönüşebilirler,
- Sitotoksiktirler,
- Zincirleme reaksiyonlarla doku nekrozuna yol açarlar,
- Kapiller permeabiliteyi artırırılar,
- Trombositler ve nötrofillerin damar duvarına yapışmasını stimüle ederler [1, 5, 9, 11, 18-20, 28-30, 35, 37, 42-44, 48, 51, 52, 54, 60, 63, 74, 76, 79, 83, 86, 87].

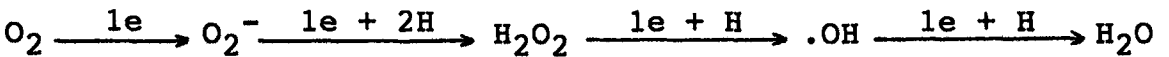
Bu radikaller birçok araştırıcı tarafından serbest oksijen radikalleri, oksiradikaller, oksijen serbest radikalleri, serbest radikaller gibi isimler altında incelenmişse de günümüzde en iyi ifade eden başlık reaktif oksijen metabolitleri (ROM) dir [54, 86].

Yaşayan organizmaların oksijen'e (O₂) ihtiyaçı ve O₂'in enerji üretiminde ne denli önemli bir yer tuttuğu bilinmektedir. Öte yandan O₂'in elektronlara olan affinitesi diğer elementlerden çok daha yüksektir. Bu da karbon, oksijen, hidrojen ve azot içeren bileşiklerin yapısını kolaylıkla değiştirebilmesini ve canlılarda çok zararlı reaksiyonlar yaratmasını açıklamaktadır [9].

Normalde moleküler O₂, sitokrom oksidaz sistemi çerçevesinde 4 elektron alarak suya redükte olur [9, 86].



Ancak O₂ birer elektron kazanarak basamak basamak redükte olduğunda ROM'nin açığa çıkmasına neden olur. Bir elektron aldığında süperoksit anyon (O₂⁻) meydana gelir. O₂⁻'la birlikte görülen hücre toksisitesi O₂⁻'un kendisinden çok, daha reaktif metabolitlerin oluşmasında prekürsör olarak rol oynamasına dayanmaktadır. Gerçekten O₂⁻'un 2 değerlikli redüksiyonu, bir başka deyişle dismutasyonu hidrojen peroksit (H₂O₂) radikali oluşumuna yol açar. O₂⁻'un dismutasyonu sıvı ortamda spontan olarak meydana gelir ve böylece in vivo olarak O₂⁻ oluşumuna her zaman H₂O₂ oluşumu eşlik eder. Moleküler O₂'den çıkan 3. radikal türü ise hidroksil radikalidir (.OH). Haber-Weiss reaksiyonu diye bilinen, O₂⁻ ile H₂O₂'nin etkileşimi sonucu meydana gelir. En güçlü oksidan ajan, yani ROM'nin en zararlısıdır [9, 18, 86]. şematik olarak basamaklar şöyledir.



ROM'nin meydana gelmesi nükleik asitler, membran lipidleri, enzimler ve reseptörler de dahil olmak üzere tüm doku biomoleküllerinin hasarına yol açar [18, 86]. Özellikle .OH hücre membranında lipid peroksidasyonu sonucu hücrenin lizisine neden olur. Membran ve hücre proteinlerine de etkiyle zarar verir [9, 18, 28, 30, 54, 74, 86].

Bu metabolitlere karşı vücutta antioksidan savunma sistemleri ve bileşikleri mevcuttur [9]. Sistem ve bileşiklerle etkileri tablo 1'de görülmektedir.

Tablo 1: Vücuttaki antioksidan savunma mekanizmaları.

<u>Sistem ve Bileşikler</u>	<u>Fonksiyon</u>
Sitokrom oksidaz sistemi	O ₂ 'in tetravalan redüksiyonu
Süperoksit dismutaz (SOD)	O ₂ 'in dismutasyonu
Katalaz ve Glutatyon peroksidaz	H ₂ O ₂ 'in giderilmesi
Transferrin, Askorbik asit, Sistein, Seruloplazmin	Hidrofilik alanlardan ROM'nin giderilmesi
Vitamin E, Yağ asitleri	Hidrofobik alanlardan ROM'nin giderilmesi

Bunların bazılarını da içeren ve dışarıdan kullanılabilen bileşikler de vardır. Bu bileşiklere serbest radikal çöpçüleri (scavenger) adı verilmiştir. ROM'ni çekip alan bileşiklerdir ki mekanizmaları kullanılan maddeye göre değişiklik gösterir (Tablo 2) .Bu maddelerin çoğu, ister SOD gibi ROM'nin ortamdaki uzaklaşmasını sağlayan reaksiyonları hızlandırır, ister allopurinol gibi bu maddeleri açığa çıkaran reaksiyonları inhibe etsin enzimatik bir mekanizma ile etkili olurlar. Nonenzimatik scavenger'lar ise ROM ara ürünlerini nötralize ederler [9].

Bu ajanların kullanılması ile hasarın azalması veya ortadan kalkması da iskemi-reperfüzyon hasarında ROM'nin ne denli önemli bir rol oynadığının açık bir kanıtıdır. Scavenger'ların etkileri detaylı bir şekilde birçok araştırmacı tarafından çalışılmıştır [1, 5, 9, 18, 29, 30, 37, 39, 53, 55, 63, 74, 76, 86, 87].

Tablo 2: ROM Scavenger'ları.

Enzimatik:	-Süperoksit dismutaz -Katalaz -Allopurinol
Nonenzimatik:	-Dimetil sulfoksit (DMSO) -Tioüre -Deferoksamin -Mannitol -Nitroblue tetrazolium
Hidrofilik:	-Askorbik asit -Glutatyon peroksidaz -Alfa metiyonin
Hidrofobik:	-Vitamin E -Barbitürat

Tedavide kullanılmaları düşünülecek olduğunda şu hususların göz önünde bulundurulması gerekir;

-O₂ metabolitleri ileri derecede reaktiftir ve ortamda kısa süreyle bulunurlar,

-Bloke edici ajanlar etkiledikleri türlere ve etki mekanizmalarına göre değişiklik gösterir,

-ROM intraselüler ve/veya ekstraselüler olarak ortaya çıkabilirler [9].

Kullanılan ajanın istenilen etkiyi yaratmaması serbest radikal mekanizmasının çalışmadığını göstermez. Başarı elde edebilmek için scavenger'ın zararlı türlere karşı aktif ve lokal çevreyle uyumlu olması gerekir. Dahası, radikalın lokalize olduğu yere gönderilebilmelidir [9].

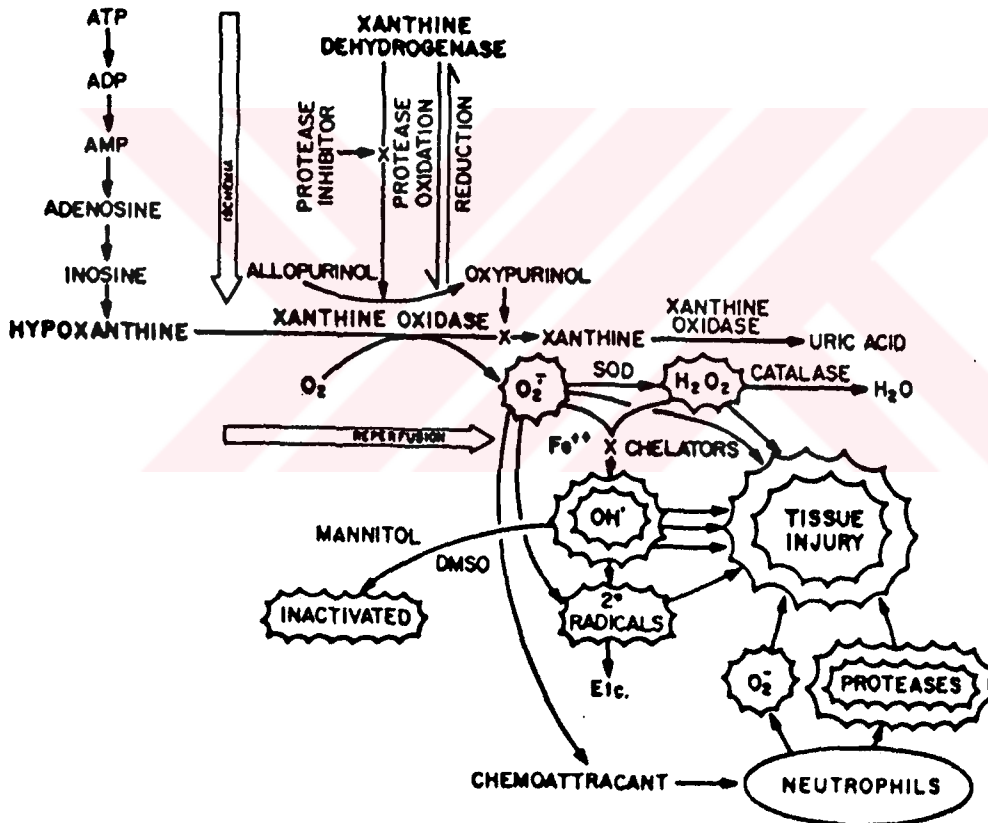
Reaktif oksijen metabolitlerinin kaynağı:

Bugüne dek yapılan çalışmalarda ROM'nin major kaynağı olarak ksantin oksidaz (XO) enzimi gösterilmiştir [1, 9, 18, 20, 22, 28-30, 33, 48, 54, 56, 58, 60, 74, 76, 84, 86].

XO normalde, noniskemik ve sağlıklı hücrede ksantin dehidrogenaz (XD) şeklinde bulunur. Enzimin bu formu purin oksidasyonu sırasında elektron transferi için O₂ yerine NAD⁺ kullanır ve böylelikle O₂⁻ veya H₂O₂ açığa çıkarmaz [86]. Oysa XO, hipoksantin veya ksantin oksidasyonu sırasında O₂⁻

ve H_2O_2 oluşmasına yol açar [18, 30, 54, 86]. Mekanizması da şöyledir: İskemik dönemde ATP hipoksantin'e katabolize olur ki bu da dokularda birikir. Düşük enerji metabolizması sonucu Ca^{++} hücre içine kayar. İntraselüler Ca^{++} daha sonra bir proteaz aracılığıyla XD'ı XO'a dönüştürür. Reperfüzyonda ortama moleküler O_2 gelince hipoksantin ve XO'la reaksiyona girerek O_2^- , H_2O_2 ve $.OH$ radikallerini üretir (Şekil 1). Bunlar da hücre membranında lipid peroksidasyonu, hyalüronik asit ve kollagen yıkımıyla doku hasarı yaparlar [30].

Şekil 1: Postiskemik dokularda ROM jenerasyonu.



Özellikle belirtilmesi gereken husus şudur: XD'ın XO'a dönüşüm hızı dokulara göre farklılık gösterirse de bu, iskemi süresiyle doğru orantılıdır [30, 86].

Nötrofillerin iskemi reperfüzyon hasarındaki rolü:

Postiskemik dokularda ROM'nin birbaşka önemli kaynağı da polimorf nüveli lökositler (nötrofiller) dir [18, 19, 28, 30, 42-44, 52, 54, 57, 74, 78, 83, 86].

Nötrofiller O_2^- 'u farklı bir enzim yoluyla açığa çıkarırlar. Bu enzim NADPH oksidazdır. Nötrofillerin hücre membranında lokalize bir enzimdir. Normalde antibakteriyel etki için gerekli olan vücudun savunma mekanizmalarından biridir. Buna rağmen anormal ve uygun olmayan nötrofil aktivasyonu ve bu inflamatuvar enzimlerin salgılanması organizmanın kendisine zarar vermekte, iskemi-reperfüzyon hasarında etiyolojik rol oynamaktadır [18, 19, 43, 44, 74, 86].

Aktive nötrofiller aynı zamanda myeloperoksidaz (MPO) enzimi de salgırlar ki bu enzim de H_2O_2 ve klorürden hipoklorik asit oluşturan reaksiyonu katalize eder. Bu reaksiyondaki H_2O_2 , NADPH oksidaz yoluyla açığa çıkmış O_2^- 'un spontan dismutasyonu ile meydana gelmektedir. Hipoklorik asit, H_2O_2 'den 100 kat fazla reaktif ve oksidan bir ajandır [18, 19, 74, 86]. Bunlardan başka elastaz, kollajenaz, proteaz, trombosit aktive edici faktör (PAF), lökotrienler gibi parankimal hücrelerde ve mikrovaskülatürde hasar, kapiller bazal membran yıkımı yapan maddeler de aktive olan nötrofillerden salgılanır. Bu maddeler sonuçta mikrovasküler permeabiliteyi ve vasküler direnci artırırırlar [18, 74, 86].

İskemi-reperfüzyon hasarında kas dokusunda nötrofillerin artışı MPO aktivitesindeki artışla ortaya konmuştur [18]. Nötrofillerin bu artışı ise katalaz, dimetiltiltioüre ve deferoksamin gibi serbest radikal scavenger'ları ile önlenmektedir. Bu verilerle de XO'dan gelişen ROM'nin aynı zamanda nötrofil aktivasyonunda direkt rol oynadığı öne sürülmüştür [18, 86]. Oysa bu etkileşim dolaylı yolla olmaktadır. XO'dan çıkan oksidanlar proinflamatuvar ajanların

üretimini ve salgılanmasını sağlar. Bu ajanlar da nötrofilleri uyarırlar.

Buraya kadar olan gözlemlerden sonra şu önemli sorunun cevaplanması gerekir. Nötrofil birikimi ve aktivasyonu iskemi-reperfüzyon hasarının bir sebebidir yoksa sonucumu? Bu soruya cevap ararken 2 değişik yaklaşımda bulunulmuştur. Birincisi antinötrofil serumlarla nötrofilleri azaltmak, diğeri ise lökositlerdeki yapışma moleküllerine yönelik monoklonal antikolarla nötrofil yapışmasını engellemektir [86].

Antinötrofil serumla nötrofiller ortamdan giderildiğinde reperfüzyon sonrası görülen mikrovasküler permeabilite artışı tamamen önlenmiştir. Bu da göstermektedir ki, reperfüzyona bağlı mikrovasküler permeabilite artışından sorumlu etken nötrofillerdir. Bir başka deyişle, nötrofiller iskemi-reperfüzyon hasarında bir sonuç değil bu hasarın nedenlerinden biridir [18, 19, 28, 86].

Nötrofillerin mikrovasküler yapıların endoteline yapışmasından sorumlu madde, membranlarında bulunan bir glikoproteindir. Monoklonal antikolar ise bu maddenin fonksiyonel kısmına yönelip bloke ederek endotele yapışmayı engellerler. Bu antikolar, reperfüzyona bağlı permeabilite artışının önlenmesinde antinötrofil serum kadar etkilidirler. Bundan çıkan sonuç ise şudur: Nötrofillerin mikrovasküler endotele yapışması reperfüzyon hasarı için şarttır [18, 86].

Nötrofillere bağlı iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde XO inhibitörlerinin etkili olduğundan daha önce söz edilmişti. Endotel veya parankim hücrelerinden ortaya çıkan ROM'nin lökosit yapışması ve aktivasyonuna direkt etkisi olmasa da, endotelial hücre membranlarındaki fosfolipaz A₂'yi aktive ederek lökotrien B₄ (LTB₄) ve PAF gibi güçlü kemotaktik ajanlar açığa çıkmasına yol açarlar [86].

Sadece endotel veya parankim hücrelerinden ortaya çıkan ROM değil, nötrofillerden gelişen oksidanlar da postkapiller venüllerde lökosit yapışmasına neden olurlar. Özellikle H₂O₂ ile görülen bu duruma PAF'ün neden olduğu söylenmektedir [86]. Bunun yanısıra insanlarda yapılan serbest doku transferleri sırasında PAF birikiminin nötrofillerden O₂⁻ üretimini artırdığı gösterilmiştir [57].

Yapılan tüm araştırmalar reperfüzyona bağlı mikrovasküler hasarda nötrofillerin aktif rolü olduğunu ortaya koymaktadır [18, 19, 42-44, 52, 54, 57, 74, 78, 83, 86]. Ancak, nötrofillerin interstisyel alana nasıl bir mekanizma ile çıktığı açıklığa kavuşmamıştır. Yapılan çalışmalar, bunda elastaz'ın önemli bir rol oynadığı ve bu enzimin bazal membranı erittiği düşünülmektedir [86].

Özetle; iskemi-reperfüzyon sonrası dokularda anlamlı bir mikrovasküler ve parankimal hücre hasarı oluşmaktadır. Reperfüzyon hasarı hem ROM'nin ortaya çıkması, hem de polimorfonükleer lökosit aktivasyonu ile gelişmektedir. XO üzerinden ortaya çıkan oksidanlar proinflamatuvar ajanların üretimi ve salgılanmasını başlatmakta, bu ajanlar da lökosit yapışması ve infiltrasyonuna yol açmaktadır. Endotele yapışan lökositler de elastaz salgıları ve/veya fizik güç ile endotel bariyerini yıkarak mikrovasküler hasarı oluşturmaktadırlar.

Günümüzde, teknolojinin de gelişmesine paralel olarak serbest doku ve organ transferlerinde oldukça büyük ilerlemeler kaydedilmiştir. Özellikle plastik cerrahide "free-flep" uygulamalarında başarı oranı %95'e ulaşmıştır. Buna rağmen en iyi koşullarda dahi %5 oranında başarısızlık söz konusudur [64]. İşte mikrovasküler araştırmaların hedefi bu başarısızlığın nedenini bulmaktır [66].

Koagülasyon mekanizmasının değişik bölümlerine etki eden birçok antitrombotik madde topikal irrigasyon [3,23,24,47, 62, 72] ve perfüzyon [21, 31, 34, 35, 36, 41, 49, 69]

solüsyonu şeklinde karşılaştırmalı olarak kullanılmıştır. Bugün organ transplantasyonlarında kullanılan "University of Wisconsin" solüsyonu [16, 17, 25], deneysel olarak ta çok değişik modellerde üzerinde önemle durulmakta olan [6, 38, 61, 80, 82] bir solüsyondur.

Travmatik nedenlerin de detaylı şekilde histolojik ve elektron mikroskopik düzeyde incelenmesi hep %5 diye yukarıda bahsedilen başarısızlığa yönelik çalışmalardır [15, 45, 65].



MATERYEL ve METOT

Bu çalışmada, ağırlıkları 150-250 gr. arası değişen 28 adet Sprague-Dawley cinsi sıçan kullanıldı.

MODEL:

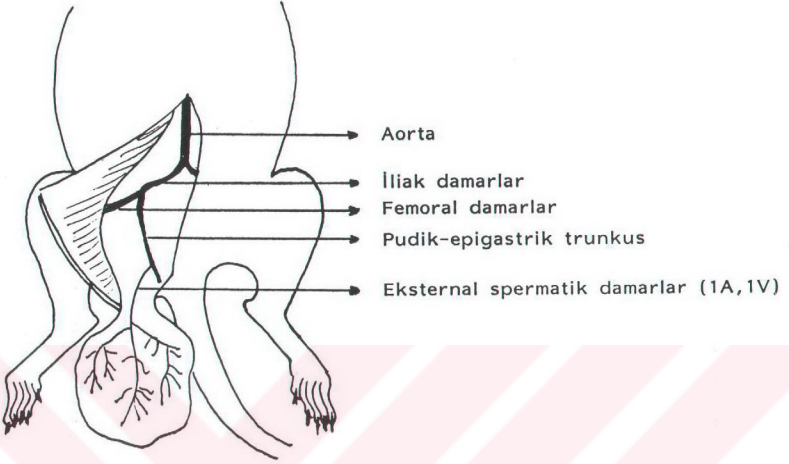
Çalışma modeli olarak ilk kez Baez'in [14] tanımladığı, daha sonra Acland'ın [7] ada flebi olarak geliştirdiği kremaster kası seçildi.

Anatomi: Bu kas skrotum içinde testisleri ayrı ayrı çevreler durumdadır. Arter ve venini pudik-epigastrik trunkustan alır. Genito-femoral sinir motor innervasyonunu yapar. Pudik-epigastrik trunkus eksternal iliak-femoral bileşkeden ayrılarak inguinal ligamana paralel bir şekilde abdominal kaslar içinde seyreder. Perineal sahada birçok dal verir. Bunlardan ve terminal dallarından biri olan eksternal spermatic arter ve ven, kremasterin 1A ve 1V damarlarını oluşturur. Kremaster içindeki arter ve venlerin sınıflandırılması da 4 sıra halinde (1A-4A, 1V-4V) yapılmıştır [14] (Resim 1, Şekil 2).

Resim 1: Kremaster damarlarının mikroskop altındaki görünümü



Şekil 2: Prepare edilmiş kremasterin şematize görünümü.

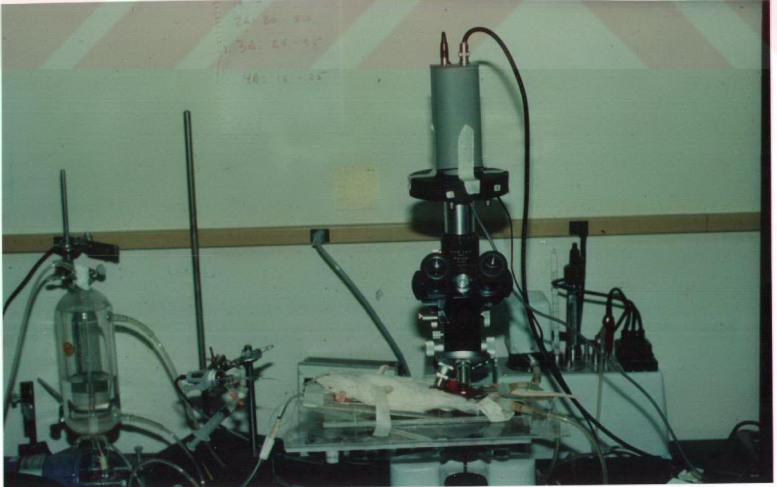


Disseksiyon: Anestezi 100 mg/kg thiopental sodium'un intraperitoneal enjeksiyonu ile sağlandı. Sol karotid arter, Statham P23 ID transdüşeri ile ortalama kan basıncı monitorizasyonu için kateterize edildi. Trakeotomi yapıp tüp yerleştirildi. Sıçan disseksiyon sırasında termostatlı bir ısıtma blanketinin üzerine konarak vücut ısısı 35-37°C arasında sabit tutuldu.

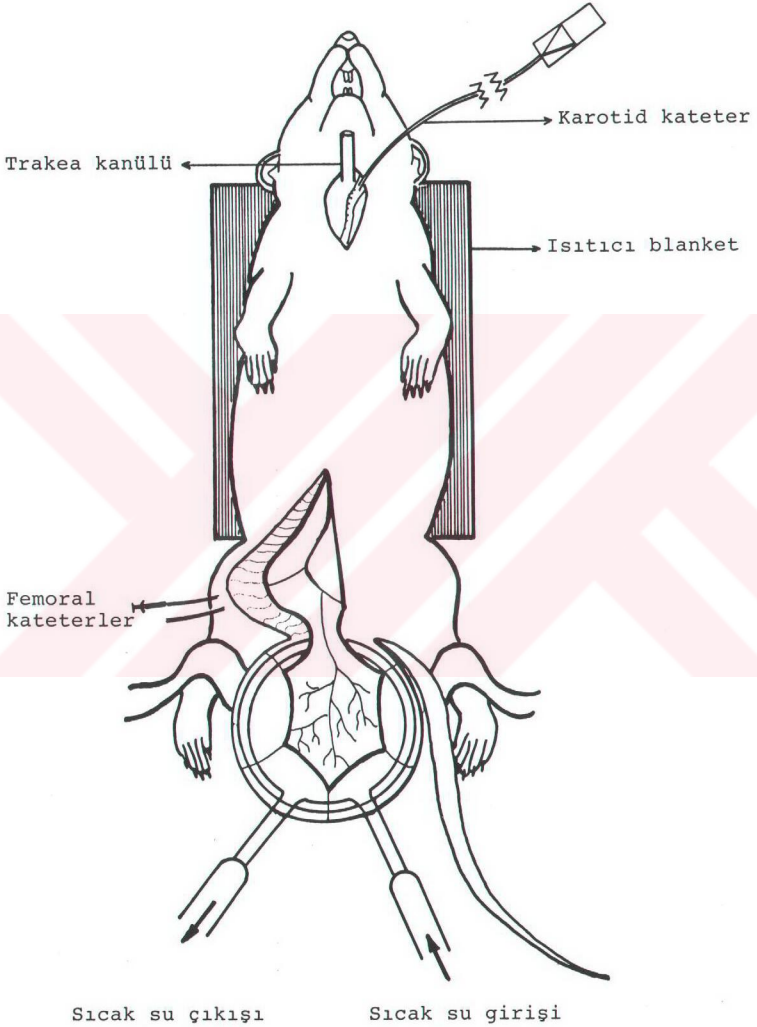
Sağ spina iliaka anterior superiorundan skrotum ucuna dek giden ve inguinal ligamanla abdominal duvarın en derin kenarını ekspoz eden insizyon yapıldı. Zeiss OpMi 6 operasyon mikroskobu ile önce femoral arter ve ven prepare edildi. İliak-femoral bileşkenin 2 cm. superiorundan inguinal ligaman ve altındaki kas tabakası koter ile yukarı doğru kesilerek karın içine girildi. İntraabdominal organlar ve yağ dokusu, iliak damarlar üzerinden aorta ekspoz olana dek disseksiyonla mediale itildi. Bu seviyeden başlanıp aşağı doğru, obturator ve genito-femoral sinirler korunmak kaydıyla iliak arter ve venin yan dalları 8:0 nylon ile

bağlanıp kesilerek prepare edildi. Bu aşamadan sonra çok hassas disseksiyonla kremaster skrotumdan ayrıldı ve ucuna 5:0 ipekle sütür geçilip askıya alındı. Testis ve epididim ile yağ dokusu, kremaster ters çevrilip koterle ayrıldı, bağlandı ve eksize edildi. Askı ipeği çekilip kas tekrar normal yüzüne çevrildi. Abdominal duvar pudik-epigastrik trunkusun 2 mm. üzerinden koterle kesildi. Trunkusun kremastere giden dalı korunarak tüm yan ve uç dalları 8:0 nylonla bağlanıp kesildi. Son olarak derin sirkumfleks iliak damarlar ve yan dalları tek tek 8:0 nylonla bağlanıp kesilerek kremaster kas-ada flebi hazırlanmış oldu. Femoral arter PE-100, ven PE-50 polietilen tüp ile kanüle edildi. Kesecik şeklindeki kas, en az damarlı ön yüzden ana arter ve veni ortada bırakacak şekilde koter ile kesildi ve açıldı. Çevresine gerdirmek ve fikse etmek için eşit aralıklarda 5-7 adet 5:0 ipek sütür kondu. Kurumayı önlemek için tüm işlem boyunca sahaya ve kasa Krebs-Henseleit doku solüsyonu damlatıldı.

Kremaster özel hazırlanmış plexiglas bir pedestal üzerine konup gerildi ve üzerine ince naylon (wrap paper) örtüldü. Pedestal içinde ısıtılmış su devirdaimi ile kas ısısı vücut ısısında tutuldu (Resim:2,Şekil:3).



Şekil 3: Mikroskobik gözleme hazır sıçanın şematik çizimi.

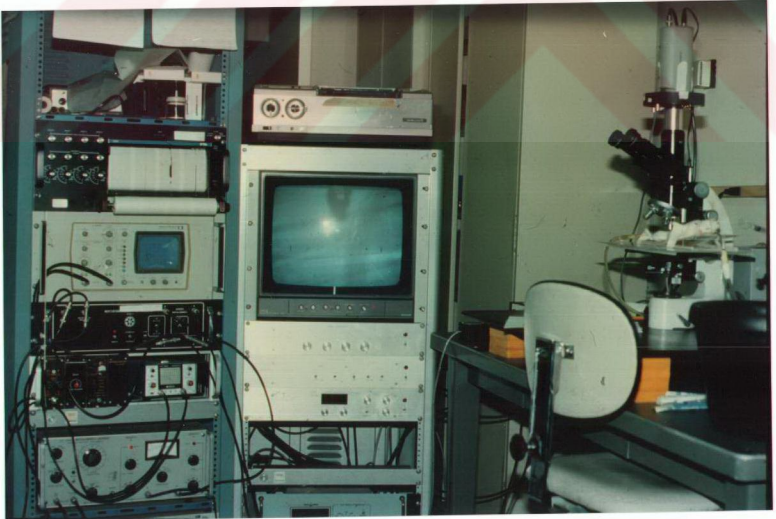


MİKROSİRKÜLASYON PARAMETRELERİ ve ÖLÇÜMLERİ:

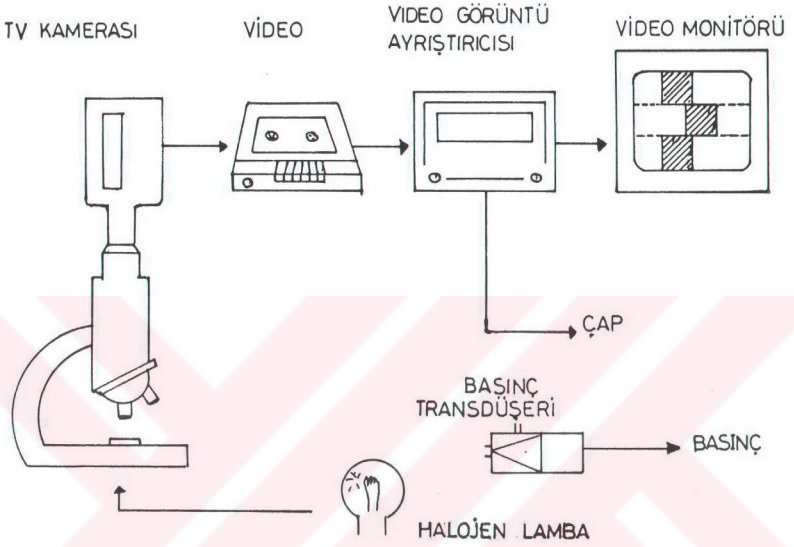
Hazırlanmış model bu kez Zeiss gözlem mikroskobuna (Thornwood, NY) aktarıldı ve kas 50 W. ısı emici filtreli halojen lamba ile transillumine edildi. Mikrosirkülatuar gözlemler öncesi, disseksiyondan etkilenen mikrovasküler tonusun stabilizasyonu için 30 dakika beklendi. Bu zaman zarfında ölçümlerin yapılacağı arter, venül ve kapiller alanlar seçilip haritası çizildi. 3 arter (1A-3A), 4 postkapiller venül ve 4 kapiller alan seçildi.

Seçilen arter ve venüller kapalı devre televizyon mikroskobisi altında incelendi. Panasonic WV-5470 video monitöründe UDx20 objektifle 640 kez, UDx40 objektifle ise 1298 kez büyültülerek gözlemlendi. Çapları Vista 308 görüntü ayrıştırıcısı ile ölçüldü (Resim:3,Şekil:4). Büyük çaplı arterler için düşük, küçük çaplı olanlar için ise yüksek büyütme kullanıldı.

Resim 3: Gözlemede kullanılan düzenek.



Şekil 4: Görüntünün monitöre aktarılıp ölçümlerin yapıldığı düzenin şeması.



Venüllerdeki nötrofil aktivasyonu (lökosit yapışması) kantitatif olarak değerlendirildi.

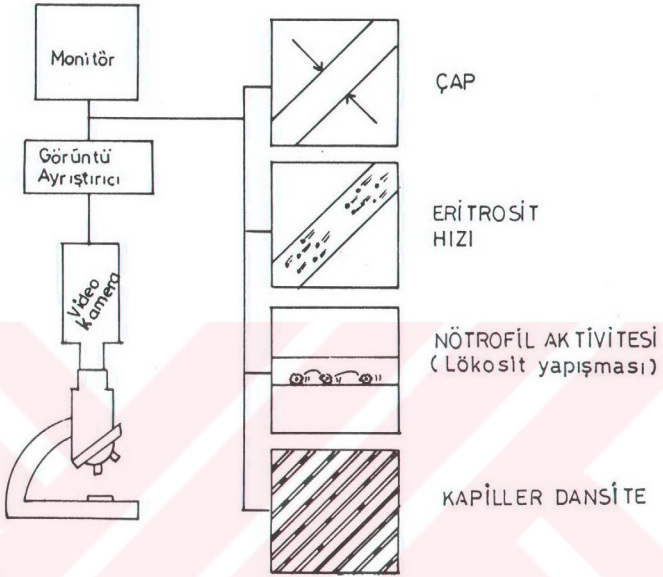
Kapiller dansite ölçümleri yapıldı.

Arterlerde ortalama eritrosit hızları "dual-slit" tekniği kullanılarak bulundu. Akım ile aynı ve karşı yönde olan eritrositlerden kalkıp dual-fiberoptik fotometre sisteminden geçen sinyallerin aralarındaki zaman farkı, Princeton Applied Research 100A sinyal korelatörü ile analize edildi. Arteriel kan akımı (mic.l/sn.), ortalama hız ve damar kesit yüzeyi alanından hesaplandı [81].

$$\text{Akım} = \text{Hız}_{\text{ort.}} \times \pi r^2$$

Tüm parametreler şekil 5'te şematize edilmiştir.

Şekil 5: Mikrosirkülatuar gözlem parametreleri.



GRUPLAR:

Sıçanlar 2'si kontrol olmak üzere 4 gruba ayrıldı.

1.Grup: 6 sıçanda iskemi uygulanmaksızın 1'er saat arayla 4 kez ölçüm yapıldı. Bu gruptaki sıçanların 3'ünde femoral kateterizasyon yapılmadı.

2.Grup: 6 sıçanda 1 kez ölçümler yapıldıktan sonra iliak pedikül klempe edilip 2 saatlik iskemi uygulandı. Reperfüzyon sonrası 1'er saat ara ile 3 kez ölçüm yapıldı. Bu grupta da 3 sıçanda femoral kateterizasyon uygulanmadı.

3.Grup: 6 sıçanda ilk ölçümlerden sonra iskemi uygulaması için iliak pediküle klempe kondu. 25 mmHg basınç altında

femoral arterden Laktatlı Ringer solüsyonu, femoral venden şeffaf akım gelene dek verilmek kaydıyla kas vaskülatürü içerdiği kandan temizlendi. 2 saat sonra reperfüzyon yapıp 3 kez ölçümler alındı.

4.Grup: 4 sıçanda 3. gruptan farklı olarak, kas University of Wisconsin solüsyonu ile yıkandı.

BULGULAR

GRUP 1

Postkapiller venül çapları ölçümlerinde anlamlı bir değişiklik saptanmadı.

Lökositlerin venül duvarlarında yuvarlanma oranı yönünden sadece ilk ölçümlerde femoral kateter uygulanan altgrupta oldukça anlamlı bir artış gözlenirken ($p<0,01$) diğer ölçümlerde fark bulunmadı.

Lökositlerin venül duvarlarına yapışıp hareketsiz kalması oranı ise 2. ve 3. ölçümlerde kateterli altgrupta anlamlı bir artış ($p<0,05$ ve $p<0,005$) gösterdi.

Kapiller dansite, arter çaplarında (1A, 2A, 3A) ve akımda bir değişiklik olmadı (Tablo:3-4).

GRUP 2

Venül çaplarında femoral kateter uygulanan grupta sadece 4. ölçümlerde anlamlı bir azalma mevcuttu ($p<0.005$).

Lökosit yuvarlanması reperfüzyon sonrası tüm ölçümlerde arttı ($p<0.01$ - $p<0.005$).

Yapışma oranı ise her iki altgrupta artarken ($p<0.05$ - $p<0.0005$), kateterli grupta diğerine göre anlamlı bir fark gözlemlendi ($p<0.05$).

Kapiller dansitede her iki altgrupta reperfüzyon sonrası belirgin düşüş oldu (Katetersiz: $p<0.005$ - 0.0005 ; kateterli: $p<0.0005$ - 0.00005). Kateterli altgrupta reperfüzyon sonrası 1. ve 2. ölçümlerde kapiller dansitedeki düşüş katetersiz altgruba oranla daha fazla iken 3. saatte fark ortadan kalktı.

Arter çaplarında sadece katetersiz 1A'da, reperfüzyon sonrası ölçümde anlamlı bir daralma ($p<0.005$) olup 2A ve 3A arterlerinde değişme görülmedi.

Akım yine katetersiz 1A'da ve reperfüzyon sonrası ölçümde azalmış bulundu ($p<0.05$). Diğer arterlerde anlamlı bir fark olmadı (Tablo:5-6)

GRUP 3

Venül çaplarında reperfüzyon sonrası preiskemik ölçümlere göre oldukça anlamlı bir daralma oldu ($p<0.00005$ - $p<0.05$).

Lökosit yuvarlanması reperfüzyondan sonra oldukça anlamlı bir şekilde arttı ($p<0.000005$ - 0.05). Yapışma oranı ise değişmedi. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında yuvarlanma ve yapışma oranında fark görülmedi.

Kapiller dansitede preiskemik döneme göre büyük düşüş ortaya çıktı. Postiskemik 1. ölçümlerde %83 ($p=0$), 2. ölçümlerde %65 ($p<5 \times 10^{-13}$), son ölçümlerde ise %73 ($p<5 \times 10^{-13}$)'e varan bir azalma oldu. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında postiskemik ilk değerler anlamlı derecede düşüktü ($p<0.05$).

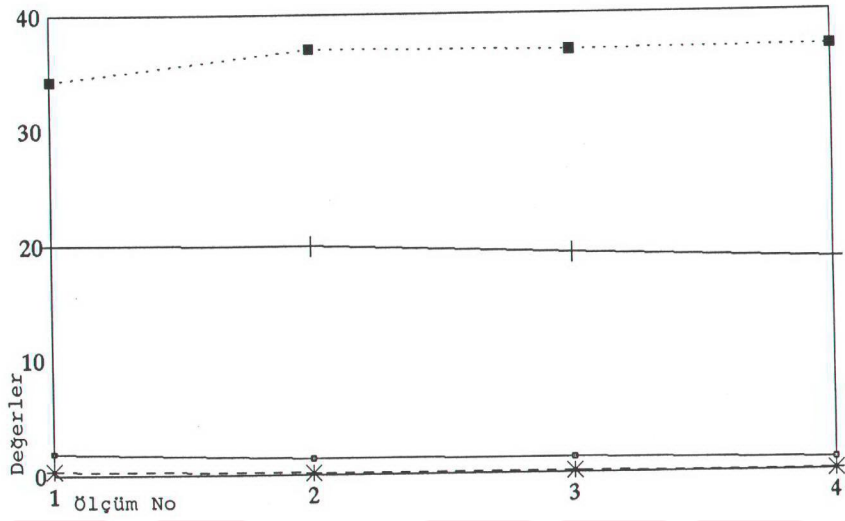
1A arter çaplarında reperfüzyon sonrası ilk ölçümlerde %26 ($p<0.05$), 2. ölçümlerde %30 ($p<0.005$), 3. ölçümler de ise %33 ($p<0.005$) daralma saptandı. 2A ve 3A arterlerde ise sadece postiskemik ilk ölçümlerde anlamlı ($p<0.05$) bir daralma oldu. Kontrol grubuyla karşılaştırıldığında her 3 sınıf arterde postiskemik anlamlı bir fark görülmedi.

Reperfüzyondan sonra akım 1A'da ölçümler sırasıyla %92 ($p<0.00005$), %81 ($p<0.0005$), %69 ($p<0.005$); 2A'da %95 ($p<0.005$), %88 ($p<0.005$), %82 ($p<0.005$) oranında azalmış bulunurken 3A' da anlamlı bir fark olmadı. Akım, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında sadece 2A'da postiskemik 1. ve 2. ölçümlerde anlamlı bir şekilde düşüktü ($p<0.005$) (Tablo:7-8).

GRUP 4

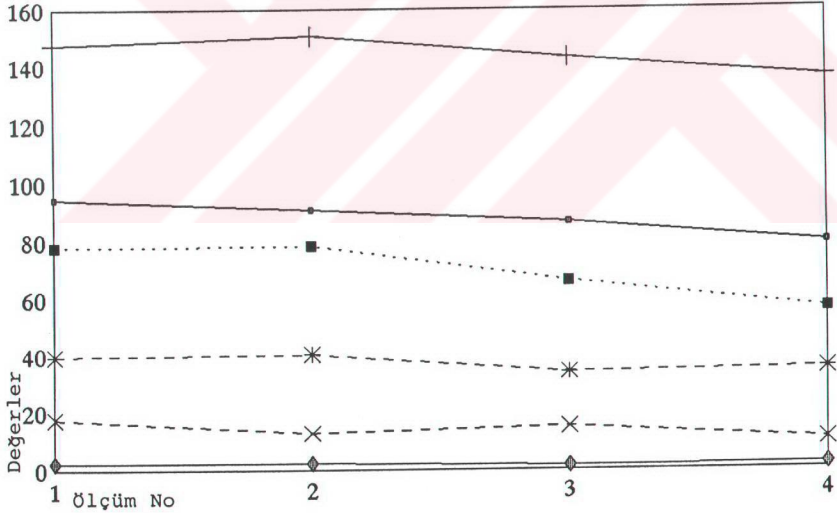
Bu gruptaki 4 hayvandan 3'ünde "no-reflow" fenomeni oluştu. Sadece 1 denekte postiskemik ilk değerler alınabildi. Bu

kasta da dolaşım durdu ve sonraki değerler alınamadı
(Tablo:9-10).



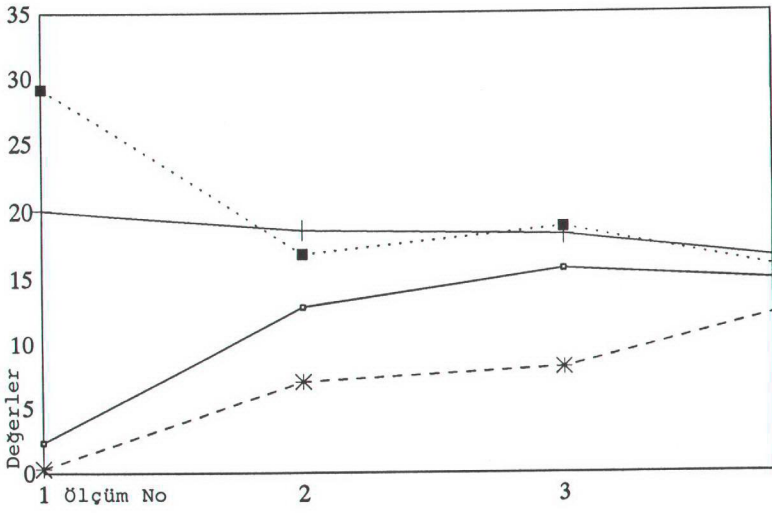
+ VENÜL ÇAPI - LÖK.YUV. * LÖK.YAP. ■ KAP.DANS.

Tablo 3: 1. Grup ölçümlerinin grafiği



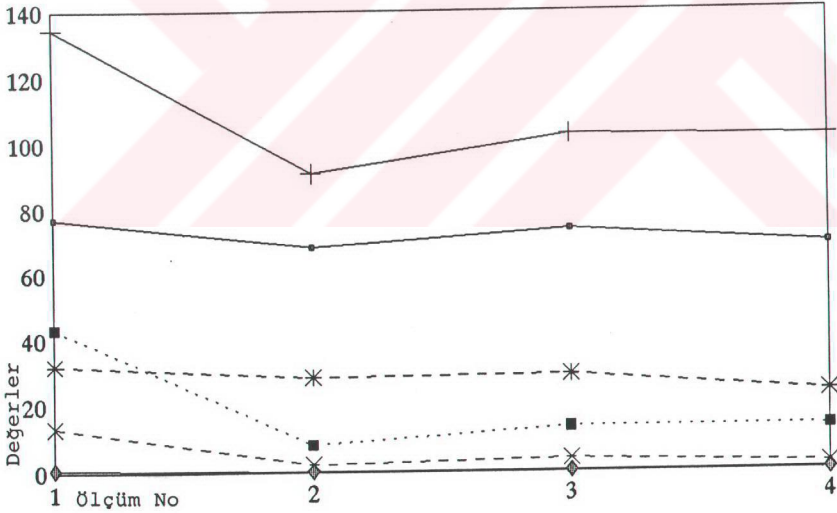
+ 1A ÇAP - 2A ÇAP * 3A ÇAP ■ 1A AKIM * 2A AKIM ◆ 3A AKIM

Tablo 4: 1. Grup ölçümlerinin grafiği



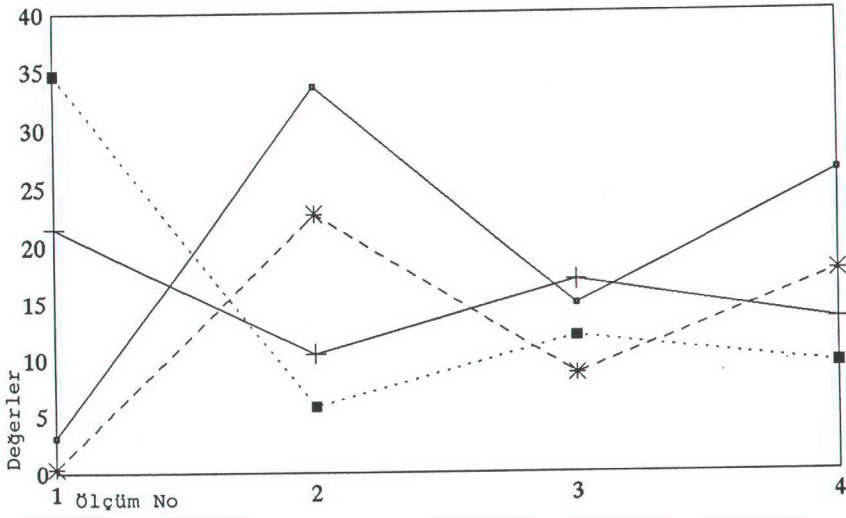
+ VENÜL ÇAPI -.- LÖK.YUV. * LÖK.YAP. ■ KAP.DANS.

Tablo 5: 2. Grup ölçümlerinin grafiği



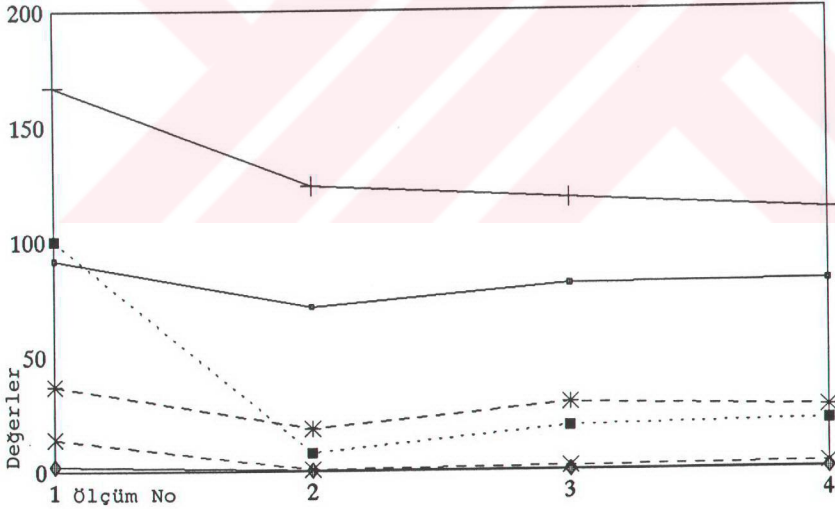
+ 1A ÇAP -.- 2A ÇAP * 3A ÇAP ■ 1A AKIM * 2A AKIM ◆ 3A AKIM

Tablo 6: 2. Grup ölçümlerinin grafiği



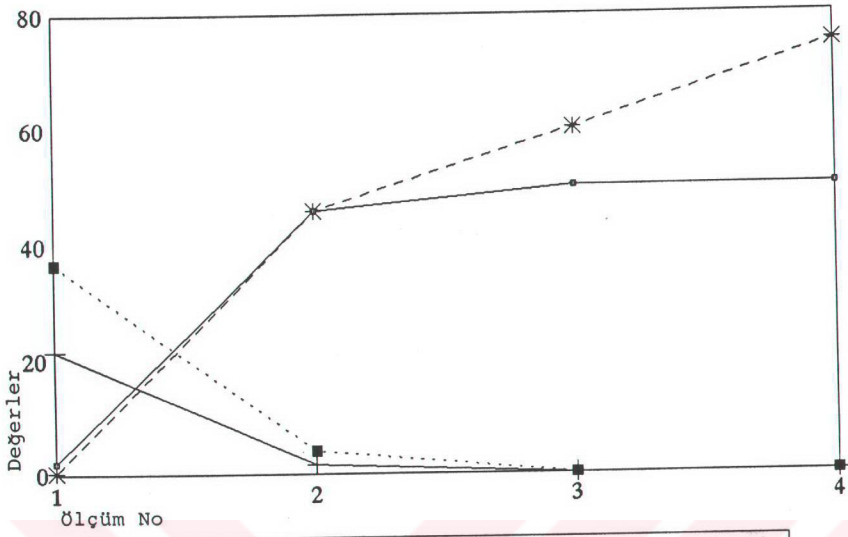
+ VENÜL ÇAPI → LÖK.YUV. * LÖK.YAP. ■ KAP.DANS.

Tablo 7: 3. Grup ölçümlerinin grafiği



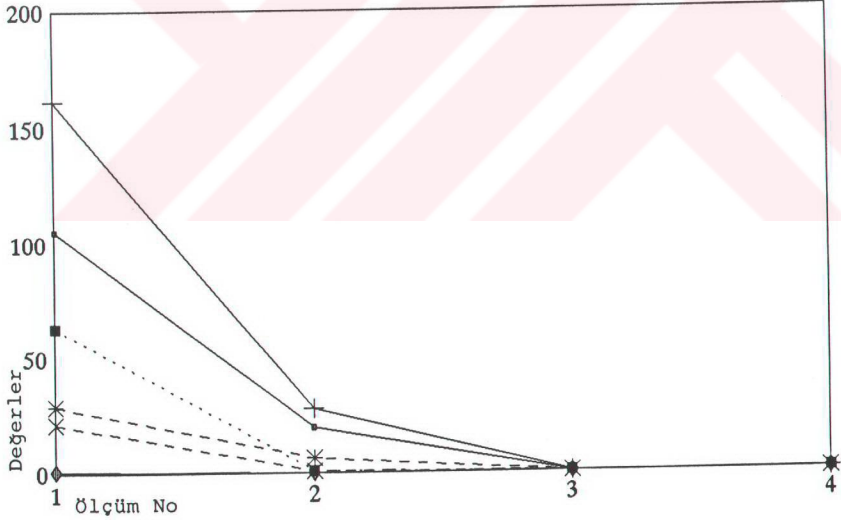
+ 1A ÇAP → 2A ÇAP * 3A ÇAP ■ 1A AKIM × 2A AKIM ◇ 3A AKIM

Tablo 8: 3. Grup ölçümlerinin grafiği



+ VENÜL ÇAPI x LÖK.YUV. * LÖK.YAP. ■ KAP.DANS.

Tablo 9: 4. Grup ölçümlerinin grafiği



+ 1A ÇAP x 2A ÇAP * 3A ÇAP ■ 1A AKIM x 2A AKIM ◆ 3A AKIM

Tablo 10: 4. Grup ölçümlerinin grafiği

TARTIŞMA

İntravital mikroskopi ile canlı dokudaki mikrosirkülasyonun incelenmesi yeni bir olay değildir. Ancak teknolojik gelişme sonucu son yıllarda bu konuda çok büyük aşama yapılmıştır. Bilgisayarlar tüm değerlendirmeleri üzerine alarak araştırmacının yükünü hafifletmiş, böylelikle sadece yeni, daha uygun modellerin bulunup geliştirilmesine zaman ayrılabilmıştır. Oldukça değişik modeller tanımlayan literatürler mevcuttur [27, 32]. En son olarak, kobayda muskülokutan bir flebin intravital mikroskobide incelenişi Hochberg ve ark. tarafından sunulmuştu [36].

Kremaster kası ise bu amaçla 20 yılı aşkın bir süredir kullanılmaktadır. İlk kez Baez tarafından tanımlanan [14] modelin anatomisini Meininger ve ark. [50], nörovasküler gelişimini ise Wang ve Prewitt [81] detaylı bir şekilde çalışmıştır. Daha sonra Acland ve Anderson izole kas ada flebi haline getirmiş [7] ve birçok araştırmada kendisi ve yanında yetişen araştırmacılar model olarak kullanmıştır [2, 4, 12, 13, 70, 71].

Bu çalışmanın modelini bir başka çalışmayla karşılaştırmak güçtür, çünkü ilk kez pedikül indirekt yoldan kateterize edilip kasa yapay perfüzyon uygulandı. Literatürde free flep simülasyonu yapılan benzer çalışmalar mevcuttur, ancak bunlar deri ve kas dokusunu incelemeye yönelik olmalarına karşın intravital mikroskopiye uygun olmayan çalışmalardır [68, 73, 80]. Bu nedenle çalışmanın ilk 2 grubu sadece kontrol grubu olmayıp, aynı zamanda iskemi-reperfüzyon hasarını göstermeye ve femoral kateterizasyonun etkisi olup olmadığını anlamaya yöneliktir.

Bugüne dek yapılan çalışmalarda iskemi-reperfüzyon hasarının en zararlı etkisinin reperfüzyondan hemen sonra görüldüğü vurgulanmıştır. [9, 18, 20, 28, 29, 30, 33, 40, 54, 60, 68, 74, 76, 86, 87]. Çalışmanın ilk 2 grubunda elde olunan

veriler bu görüşü destekledi. Reperfüzyon sonrası dönemde tüm parametreler kötü yönde etkilenmesine karşın en çarpıcı ve fazla sapma ilk ölçümlerde alındı.

Reperfüzyon hasarından en çok kapiller dansite ve lökositlerin etkilendiği görüldü. Kapillerlerin etkilenmesi Acland'ın benzer modeldeki bir emboli çalışmasında [2] elde ettiği bulgularla uyumludur.

Arter çapları ve akım değerleri karşılaştırıldığında sadece 1A arterlerinde daralma ve akım azalması görülürken, 2A ve 3A'larda değişiklik olmadığı yani reperfüzyondan etkilenmediği saptandı. Bu bulgular Siemionow'un bulgularıyla uyumlu olmakla beraber, Siemionow sadece 1A'larda çap ve akım ölçümleri yapmıştır [70, 71]. Bu nedenle 2A ve 3A arterlerinin iskemi reperfüzyon hasarından etkilenmediğini söylerken, literatürde karşılaştırma yapabileceğimiz bir çalışma henüz yoktur.

Femoral arter ve vene kateter uygulamasının, venül çaplarında reperfüzyon sonrası geç dönemde ve lökosit yapışması ile kapiller dansite düşüşünde olumsuz etkisi olduğu söylenebilir. Ancak reperfüzyon sonrası 1A'daki düşüş katetersiz grupta daha anlamlı bulundu. Üstelik katetersiz grupta da lökosit yapışması anlamlı idi. Denek sayısının az olması nedeniyle bazı bulguların rastlantı olduğu yönünde bir eleştiri olabilir ancak rastlantı olabilecek bulgular değerlendirme dışı bırakılmıştır. Burada tekrarlanan sonuçlardan bahsedilmektedir. Ayrıca mikrovaskülatürdeki damarların çap değişiklikleri istatistiksel olarak anlam taşımaya bile klinik olarak büyük önem taşır. Dahası böylesi mikrovasküler bir çalışmada disseksiyon travmasının etkisi olmaması düşünülemez. Femoral arter ve ven kateterize edilmek için disseksiyon daha da genişletilmiştir. Nitekim, hiçbir iskemi veya lokal perfüzyon solüsyonu uygulanmamış 1. gruptaki hayvanlardaki ilk ölçümlerde, teorik olarak hiçbir lökosit yuvarlanması görülmemesi gerekirken tek tük hücrede bu olay gözlenmiştir. Kateterizasyonun etkisi varsa bile bu

etki çok anlamlı değildir ve kontrol grubunun da kateterizasyonu ile uniformite sağlanacaktır. Bu nedenle çalışmanın kontrol grubu olarak kateterli grup değerlendirildi.

Çalışmada denenen lokal perfüzyon solüsyonlarının ikisi de tüm parametreler yönünden zararlı bulundu. Özellikle yıllardır soğuk organ prezervasyonunda başarıyla kullanılagelen "University of Wisconsin" solüsyonu kullanılan 4. grupta, genel olarak dolaşımın geri dönmemesi ilginçtir. Bu bulgu Turk ve ark.nın çalışmasına oldukça ters düşmektedir. Turk ve ark. inferior epigastrik pediküllü deri ada flebi modelinde femoral pedikülden lokal perfüzyonu sağlamıştır. Laktatlı Ringer ve UW solüsyonlarını kontrollerle karşılaştırmış ve UW solüsyonunun derideki kritik iskemide zamanını 30 saate (normalin 3 katı), Laktatlı Ringer'in ise 18 saate (normalin 1.5 katı) çıkardığını göstermiştir [80]. Bu çalışmanın bulgularıyla taban tabana zıt bulgulardır, çünkü sadece UW değil Laktatlı Ringer solüsyonu da reperfüzyon hasarını alevlendirdi.

Bulguların ışığında UW solüsyonunun sıcak iskemide zararlı olduğu sonucuna varıldı ki bu da Turk'ün çalışmasına ters düşmektedir, çünkü onlar da solüsyonu sıcak iskemide kullanmıştır [80].

Sistemik kan basıncında deneyler süresince değişme olmadığından bu değerlerle bir analize gerek duyulmadı. Oysa Delano ve ark. sistemik kan basıncının mikrosirkülasyona etkilerini etraflıca çalışmıştır [26].

Modelin üzerinde tartışmakta fayda vardır. Tartışmanın başında da söylendiği gibi çok çeşitli modeller tanımlanmıştır. Örn; Taleinsik ve ark. ilk kez yağ dokusunda iskemide-reperfüzyon hasarını incelemiştir.

Model, yapılacak olan çalışmanın amaçlarına uygun olmalıdır. Her modelin kendine göre avantajı ve dezavantajı vardır.

İzole kremaster kas ada flebinin sağladığı faydalar şöyle özetlenebilir:

Klinik olarak free flep olgularının simülasyonunu mümkün kıldı.

Flep pedikülünün indirekt kateterizasyonu ile kas ilk kez retrograd olarak perfüze ve drene edildi.

Değişik perfüzyon solüsyonlarının iskemi-reperfüzyon hasarına etkileri çalışıldı.

Reperfüzyon hasarının üzerine verilen bilgiler ve bu fenomenin fizyopatolojisi direkt olarak gözle görüldü, izlendi.

Modelin dezavantajları ise şunlardır:

Yapan kişi iyi bir mikrocerrahi eğitimi ve tekniğine sahip olmalıdır. Disseksiyon en iyi şartlarda 3 saat sürmektedir. Aortadan pudik-epigastrik trunkusa dek irili ufaklı yaklaşık 10-15 dal tek tek disseke edilip bağlanarak kesilmektedir. Her ne kadar Acland bu işlemleri bipolar koterle yapıyorsa da [4], çalışmada koterle başarı sağlanamadı. En ufak bir yan dalın kanaması mikrosirkülasyonu kötü yönde etkiledi.

2 saatlik iskemi süresi reperfüzyon hasarının oluşması ve gösterilmesi için yeterli bulundu, ancak daha uzun süreli iskemide reperfüzyon sonrası gelişen ödem kasın ışık geçirgenliğini azaltmış ve veri toplamak güçleşmiştir. Bu bulgu da Siemionow'un bulgularıyla ters düşmektedir, çünkü bir çalışmasında denervasyon sonrası uzun süreli takip için kası katlayıp femoral bölge poşuna gömmüştür [70]. Ancak bu çalışmasında sadece 1A arterlerini ve kapiller dansiteyi değerlendirmiş, venül ve 2A, 3A arterlerini izlememiştir. Aynı araştırmacı bir diğer çalışmasında kasa 10 saat iskemi uygulamış ancak yine sadece 1A ve kapiller dansiteyi değerlendirmiştir [71]. Oysa çalışmada görülen uzun süreli

iskemide gelişen ödem kapiller dansiteyi bile değerlendirmeyi engelliyecek vasıftaydı.

Birbaşka konu kasın femoral arterden retrograd perfüzyonunun 25-50 mmHg basınç altında yapılması şarttır. Bu pek zor olmamakla beraber bir transdüşer yardımıyla monitörize edilmeden elle kontrolü de mümkün değildir. Yapılan önçalışmada birkaç kez elle verilmesi denendi ve en düşük basıncın 100 mmHg olduğu görüldü. Hepsinde de akımın geri dönmeyişi fazla basınç nedeniyle endotel hasarını akla getirdi. Bu da Acland'ın düşüncelerine uymayan bir durumdur. Kendisi basıncın pek o denli etkilemeyeceğini, hatta şu sıralarda aynı modelle yapmaya başladığı çalışmada perfüzyon solüsyonu olarak otolog kan kullandığını ve bunu da 600 mmHg basınçla verdiğini açıkladı. Tek sorununun da 600 mmHg basıncı sağlayabilmekteki güçlük olduğunu vurguladı [4].

Sonuç olarak; modifiye edilerek ilk kez perfüze edilen izole kremaster kas ada flebinin, mikrocerrahi girişimlerin mikrosirkülatuar sonuçlarını çalışmak için eşsiz bir model olduğu kanısına varıldı. İskelet kasındaki iskemi-reperfüzyon hasarının ve değişik perfüzyon solüsyonları ile ilaç etkilerinin, mikrosirkülasyon düzeyinde ortaya konması için intravital mikroskobiyeye uygun bugün için tek model olduğu düşünöldü. Bu çalışmadaki veriler daha önce bahsedilen %5 başarısızlığın nedenlerinden en azından birine ışık tutup başarıya doğru bir adım daha yaklaşmamızı sağlayabilir.

Geleceğe dönük planlar ise şunlardır:

Modelden pre ve postiskemik kan ve/veya doku örnekleri alarak biokimyasal düzeyde de reaktif oksijen metabolitlerini ortaya koymak.

Histolojik ve elektron mikroskobik tekniklerle kapiller endotelial bütünlüğü ve ultrastrüktürü gözlemek.

KAYNAKLAR

- 1) Abdalla EK, Caty MG, Guice KS, Hinshaw DB, Oldham KT: Arterial levels of oxidized glutathione (GSSG) reflect oxidant stress in vivo. *Journal Surg Research*. 48:291-296, 1990.
- 2) Acland RD, Anderson GL, Siemionow M, McCabe SJ: Direct in vivo observations of embolic events in the microcirculation distal to a small-vessel anastomosis. *Plast. Reconstr. Surg*. 84:280, 1989.
- 3) Acland RD, Lubbers LL, Grafton RB, Bensimon R: Irrigating solutions for small blood vessel surgery—a histologic comparison. *Plast. Reconstr. Surg*. 65:460, 1980.
- 4) Acland RD: Personal communication.
- 5) Adams JD, Lauterburg BH, Mitchell JR: Plasma glutathione and glutathione disulfide in the rat: regulation and response to oxidative stress. *J. Pharm. Exper. Therap*. 227: 749, 1983.
- 6) Aeba R, Kenan RJ, Hardesty RL, Yousem SA, Hamamoto I, Griffith BP: University of Wisconsin solution for pulmonary preservation in a rat transplant model. *Ann. Thorac. Surg*. 53:240-6, 1992.
- 7) Anderson GL, Acland RD, Siemionow M, McCabe SJ: Vascular isolation of the rat cremaster muscle. *Microvasc. Res*. 36:56, 1988.
- 8) Angel MF, Knight KR, Mellow CG, Morison WA, O'Brien BM: The effect of prior elevation of skin flaps and ischemia on blood thromboxane levels. *Ann. Plast. Surg*. 22:501, 1989.
- 9) Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, Basford RE, Futrell JW: Free radicals: Basic concepts concerning their chemistry, pathophysiology, and relevance to plastic surgery. *Plast. Reconstr. Surg*. 79:990, 1987.
- 10) Arnljots B, Wieslander JB, Dougan P, Salemark L: Prevention of microvascular thrombosis with low-dose tissue plasminogen activator. *Plast. Reconstr. Surg*. 90:281, 1992.
- 11) Babajanian M, Zhang WX, Turk JB, Weinberg J, Biller HF, Urken ML: Temporal factors affecting the secondary critical ischemia of normothermic experimental skin flaps. *Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg*. 117:1360, 1991.
- 12) Barker JH, Acland RD, Anderson GL, Patel J: Microcirculatory disturbances following the passage of emboli in an experimental free-flap model. *Plast. Reconstr. Surg*. 90: 95, 1992.
- 13) Barker JH, Anderson GL, O'Shaughnessy M, Pierangeli S, Acland RD: Embolic injury to the microcirculation in a free flap model is thromboxane A₂ (TXA₂) mediated. Presented at the PSEF Meeting Toronto Canada, May 1992.

- 14) Baez S: An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc. Res.* 5:384, 1973.
- 15) Baxter TJ, O'Brien BM, Henderson PN, Bennett RC: The histopathology of small vessels following microvascular repair. *Brit. J. Surg.* 59:617, 1972.
- 16) Belzer FO, Southard JH: Principles of solid-organ preservation by cold storage. *Transplantation* 45:673, 1988.
- 17) Blankensteijn JD, Terpstra OT: Liver preservation: The past and the future. *Hepatology* 13:1235, 1991.
- 18) Carden DL, Korthuis RJ: Mechanisms of postischemic vascular dysfunction in skeletal muscle: implications for therapeutic intervention. *Microcirc. Endoth. Lymphatics* 5: 277, 1989.
- 19) Carden DL, Smith JK, Korthuis RJ: Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. (Role of granulocyte adherence). *Circulation Res.* 66:1436, 1990.
- 20) Caty MG, Schmeling DJ, Friedl HP, Oldham KT, Guice KS, Till GO: Histamine: a promoter of xanthine oxidase activity in intestinal ischemia-reperfusion. *J. Pediatric Surg.* 25:218, 1990.
- 21) Chait LA, May JW, O'Brien BM, Hurley JV: The effects of the perfusion of various solutions on the no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 61:421, 1978.
- 22) Concannon MJ, Kester CG, Welsh CF, Puckett CL: Patterns of free radical production after tourniquet ischemia: implications for the hand surgeon. *Plast. Reconstr. Surg.* 89:846, 1992.
- 23) Cooley BC, Gould JS: Topically applied antithrombotic agents offer a new therapeutic approach to the prevention of microvascular thrombosis. *Microsurg.* 12:281, 1991.
- 24) Cox GW, Runnels S, Hsu HSH, Das SK: A comparison of heparinized saline irrigating solutions in a model of microvascular thrombosis. *Brit. J. Plast. Surg.* :345, 1992.
- 25) D'alessandro AM, Stratta RJ, Sollinger HW, Kalayoglu M, Pirsch JD, Belzer FO: Use of UW solution in pancreas transplantation. *Diabetes* 38: 7, 1989.
- 26) Delano FA, Schmid-Schonbein GW, Skalak TC, Zweifach BW: Penetration of the systemic blood pressure into the microvasculature of rat skeletal muscle. *Microvasc. Res.* 41:92, 1991.
- 27) Dunn RM, Mancoll J: Flap models in the rat: A review and reappraisal. *Plast. Reconstr. Surg.* 90:319, 1992.

- 28) Epstein FH: The role of reperfusion induced injury in the pathogenesis of the crush syndrome. *NEJM* 324:1417, 1991.
- 29) Feller AX, Roth AC, Russell RC, Eagleton B, Suchy H, Debs N: Experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury to skeletal muscle. *Ann. Plast. Surg.* 22:321, 1989.
- 30) Granger DN, Hollwarth ME, Parks DA: Ischemia-reperfusion-injury: role of oxygen derived free radicals. *Acta Physiol. Scand.* 548:47, 1986.
- 31) Greenberg BM, Masem M, May JW: Therapeutic value of intravenous heparin in microvascular surgery: an experimental vascular thrombosis study. *Plast. Reconstr. Surg.* 82:463, 1988.
- 32) Gregory CR, Gourley IM: Identification of muscle flaps in small animals. *Microsurg.* 12:136, 1991.
- 33) Hallenbeck JM, Dutka AJ: Background review and current concepts of reperfusion injury. *Arch. Neurol.* 47:1245, 1990.
- 34) Harashina T, Buncke H: Study of washout solutions for microvascular replantation and transplantation. *Plast. Reconstr. Surg.* 56:542, 1975.
- 35) Hobson II RW, Wright JG, Fox D, Kerr JC: Heparinization reduces endothelial permeability and hydrogen ion accumulation in a canine skeletal muscle ischemia-reperfusion model. *J. Vascular Surg.* 7:585, 1988.
- 36) Hochberg J, Raman M, Cilento E, Kemp K, Barnett M, Thomas R, Reilly FD: An in vivo model to study microcirculation in myocutaneous flaps. Presented at 61st Annual Scientific Meeting of ASPRS, PSEF, ASMS Washington DC, September, 1992.
- 37) Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann. Surg.*
- 38) Jacobsson J, Odland B, Tufveson G, Wahlberg J: Improvement of renal preservation by adding lidoflazine to University of Wisconsin solution: an experimental study in rat. *Cryobiology* 29:305, 1992.
- 39) Kerrigan CL, Daniel RK: Pharmacologic treatment of the failing skin flap. *Plast. Reconstr. Surg.* 1:25, 1991.
- 40) Klitzman B, Ruff G: Anastomotic thrombosis, alteration of the coagulation cascade, and ischemia-reperfusion. *Prob. Plast. Reconstr. Surg.* 1:25, 1991.

- 41) Labosky DA: Selective heparinization of venous anastomosis in latissimus dorsi free flaps to cover lower-extremity soft-tissue defects. *Microsurgery* 12:301, 1991.
- 42) Lee C, Kerrigan CL: Neutrophil localization following reperfusion of ischemic skin flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 89:910, 1992.
- 43) Lee C, Kerrigan CL, Picard-Ami LA: Cyclophosphamide-induced neutropenia: effect on postischemic skin flap survival. *Plast. Reconstr. Surg.* 89:1092, 1992.
- 44) Lee C, Kerrigan CL, Tellado JM: Altered neutrophil function following reperfusion of an ischemic myocutaneous flap. *Plast. Reconstr. Surg.* 89:916, 1992.
- 45) Margic K: Early changes in dissected small vessels: experimental study on rat arteries and veins. *Plast. Reconstr. Surg.* 75:375, 1983.
- 46) May JV, Chait LA, O'Brien BM, Hurley JV: The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast. Reconstr. Surg.* 61:256, 1978.
- 47) Mazer M, Barbieri CH, Goncalves RP: Effect of different irrigating solutions on the endothelium of small arteries: experimental study in rats. *Microsurgery* 7:9, 1986.
- 48) McCutchan HJ, Schwappach JR, Enquist EG, Walden DL, Terada LS, Reiss OK, Leff JA, Repine JE: Xanthine oxidase-derived H₂O₂ contributes to reperfusion injury of ischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 258:H1415, 1990.
- 49) Mehl RL, Paul HA, Shorey WD, Schneewind JH, Beattie EJ: Patency of the microcirculation in the traumatically amputated limb—a comparison of common perfusates. Presented at 23rd Annual Session of the AAST, San Francisco CA, Oct. 1963.
- 50) Meininger GA, Fehr KL, Yates MB: Anatomic and haemodynamic characteristics of the blood vessels feeding the cremaster skeletal muscle in the rat. *Microvasc. Res.* 33:81, 1987.
- 51) Menger MD, Barker JH, Messmer K: Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle. *Plast. Reconstr. Surg.* 89:1104, 1992.
- 52) Oude Egbrink MG, Afors KE: Influence of platelet-vessel wall interactions on leukocyte rolling in vivo. *Circ. Res.* 70:355, 1992.
- 53) Oz MC, Zikria BA, McLeod PF, Popilkis SJ: Hydroxyethyl starch macromolecule and superoxide dismutase effects on myocardial reperfusion injury. *Amer. J. Surg.* 162:59, 1991.

- 54)Pang CY: Ischemia-induced reperfusion injury in muscle flaps: pathogenesis and major source of free radicals. J. Reconstr. Microsurg. 6:77, 1990.
- 55)Pang CY, Forrest CR, Moris SF: Pharmacological augmentation of skin flap viability: a hypothesis to mimic the surgical delay phenomenon or a wishfull thought. Ann. Plast. Surg. 22:293, 1989.
- 56)Picard-Ami LA, MacKay A, Kerrigan CL: Pathophysiology of ischemic skin flaps: differences in xanthine oxidase levels among rats, pigs and humans. Plast. Reconstr. Surg. 87:750, 1991.
- 57)Pitman III JM, Ambruso DR, Law CK, Ketch LL: Accumulation of platelet activating factor (PAF) during free tissue transfer primes neutrophil (PMN) superoxide anion (O₂⁻) production. Presented at PSEF Meeting Toronto, Canada, May 1991.
- 58)Poggetti RS, Moore FA, Moore EE, Koeike K, Banerjee A: Simultaneous liver and lung injury following gut ischemia is mediated by xanthine oxidase. J. Trauma 32:723, 1992.
- 59)Proctor KG, Shatkin S Jr.: Arachidonic acid metabolites: basic concepts relevant to plastic surgery. J. Reconstr. Microsurg. 4:421, 1988.
- 60)Punch J, Rees R, Cashmer B, Wilkins E, Smith DJ, Till GO: Xanthine oxidase: Its role in the no-reflow phenomenon. Surgery 111:171, 1992.
- 61)Rao VK, Burris DE, Gruel SM: Preservation of the rat hindlimb using UW solution. J. Reconstr. Microsurgery 7:278, 1991.
- 62)Reichel CA, Croll GH, Puckett CL: A comparison of irrigation solutions for microanatomoses. J. Hand Surg. 13A:33, 1988.
- 63)Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. Amer. J. Surg. 161:48, 1991.
- 64)Salem L: International survey of current microvascular practices in free tissue transfer and replantation surgery. Microsurgery 12:308, 1991.
- 65)Savoie FH, Cooley BC, Gould JS: Evaluation of the effect of pharmacologic agents on crush-avulsion arterial injuries: a scanning electron microscopy study. Microsurgery 12:292, 1991.
- 66)Serafin D: Microsurgical composite tissue transplantation: An overview of specific problems and treatment rationale in specific areas. Probl. Plast. Reconstr. Surg. 1:1, 1991.
- 67)Servant JM, Ikuta Y, Harada Y: A scanning electron microscope study of microvascular anastomoses. Plast. Reconstr. Surg. 57:329, 1976.

68)Sexton WL, Korthuis RJ, Laughlin MH: Ischemia-reperfusion injury in isolated rat hindquarters. J. Appl. Physiol. 68:387, 1990.

69)Siegel DB: Use of anticoagulants in replantation and elective microsurgery. Microsurgery 12:277, 1991.

70)Siemionow M, Kimura H, Lister GR: The effect of muscle flap denervation on flow hemodynamics, a new model for prolonged in vivo studies. Presented at PSEF meeting, Toronto, Canada, May 1991.

71)Siemionow M, Romanowski L, Lister GR: Critical survival time of island muscle flaps following prolonged hypothermic ischemia. Presented at PSEF meeting, Toronto, Canada, May 1991.

72)Sinclair S: The importance of topical heparin in microvascular anastomoses: a study in the rat. Brit. J. Plast. Surg. 33:422, 1980.

73)Sternbergh III CW, Adelman B: The temporal relationship between endothelial cell dysfunction and skeletal muscle damage after ischemia and reperfusion. J. Vascular Surg. 16:30, 1992.

74)Sussman MS, Bulkey GB: Oxygen-derived free radicals in reperfusion injury. Methods in Enzymology 186:711, 1990.

75)Suval WD, Duran WN, Boric MP, Hobson II RW, Berendsen PB, Ritter AB: Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. Amer. J. Surg. 154:211, 1987.

76)Suzuki S, Yoshioka N, Isshiki N, Hamanaka H, Miyachi Y: Involvement of reactive oxygen species in post-ischaemic flap necrosis and its prevention by antioxidants. Br. J. Plast. Surg. 44:130, 1990.

77)Taleinsik A, Taylor T, Barends G, Shaw W: Quantitative assessment of fat volume loss and structural change following ischemia and reperfusion. Presented at 61st Annual Meeting of ASPRS, PSEF, ASMS Washington DC, September, 1992.

78)Tangelder GJ, Arfors KE: Inhibition of leukocyte rolling in venules by protamine and sulfated polysaccharides. Blood 77:1565, 1991.

79)Tangelder GJ, Oude Egbrink MG, Slaaf DW, Reneman RS: Blood platelets: an overview. J. Reconstr. Microsurg. 7:305, 1991.

80)Turk JB, Zhang WX, Babajanian M, Urken ML, Biller HF, Weinberg H: The use of a new perfusate in experimental microvascular flaps: a threefold increase in ischemic tolerance. J. Reconstr. Microsurg. 7:305, 1991.

- 81)Wang DH, Prewitt RL: Microvascular development during normal growth and reduced blood flow: introduction of a new model. Am. J. Physio. 260:H1966, 1991.
- 82)Weinberg H, Zhang WX, Urken ML: UW solution as a microvascular free-flap perfusate. J. Reconstr. Microsurg. 8:258, 1992.
- 83)Weiss SJ: Tissue destruction by neutrophils. NEJM 320:365, 1989.
- 84)Wilkins EG, Punch J, Rees Rs, Cashmere MS, Till GO, Smith DJ: Evidence for xanthine oxidase activity in human free flaps following reperfusion. Presented at PSEF meeting April 1990, Houston, Texas.
- 85)Yanagizawa-Miwa A, Uchida Y, Nakamura F, Tomaru T, Kido H, Kamiyo T, Kurashima C, Ito H: Salvage of infarcted myocardium by angiogenic action of basic fibroblast growth factor. Science 257:1401, 1992.
- 86)Zimmerman BJ, Granger DN: Reperfusion injury. Surg. Clin. N.A. 72:65, 1992.
- 87)Zimmerman TJ, Sasaki GH, Khattab S: Improved ischemic island skin flap survival with continuous intraarterial infusion of adenosine triphosphate-magnesium chloride and superoxide dismutase: a rat model. Ann. Plast. Surg. 18:218, 1987.