

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

79424

RAT ARKA BACAK İSKEMİ-REPERFÜZYON MODELİNDE
KAN AKIMININ KADEMELİ VERİLMESİNİN
REPERFÜZYON HASARINA ETKİSİ



UZMANLIK TEZİ

DR. ŞAKİR ÜNAL

79424

T.C. GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK VE REKONSTRÜKTİF CERRAHİ ANABİLİM DALI

ANKARA-1999

ÖNSÖZ

'Rat arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde kan akımının kademeli verilmesinin reperfüzyon hasarına etkisi' başlıklı tez çalışmamın fikir aşamasından itibaren, her basamakta bilimsel ve teknik desteğini aldığım tez danışmanım Prof.Dr. Kenan Atabay'a sonsuz teşekkürlerimi sunarım

Tez çalışmalarım sırasında, değerli görüşlerini ve hoşgörülerini esirgemeyen Plastik ve Rekonstrüktif Cerrahi A.D. Başkanı Sn.Prof.Dr. Cemalettin Çelebi'ye, Sn.Doç.Dr. Seyhan Çenetoğlu'na, Sn.Doç.Dr. Osman Latifoğlu'na, Sn.Uz.Dr. Reha Yavuzer'e, Sn.Uz.Dr. Sühan Ayhan'a, tez çalışmamın yürütülmesi esnasında her türlü desteğini gördüğüm Sn.Dr. Yavuz Demir, Sn.Dr.Selahattin Özmen ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma, GÜTF Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn.Yrd.Doç.Dr. Sibel Yenidünya'ya, GÜTF Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Sn.Yrd.Doç.Dr. Banu Sancak'a, Sn.Dr. Sakine Candan'a, Sn.Vet.Dr. Şeyda Diker'e, Sn. Osman Uçakçı'ya teşekkür ederim.

Aynı zamanda, araştırma laboratuvarlarının hertürlü olanaklarından yararlanmama izin veren HÜTF Farmakoloji Anabilim Dalı'na, bilimsel ve teknik desteğini aldığım Sn.Doç.Dr. M.Oğuz Güç'e ve Sn.Dr. Gökhan Yılmaz'a teşekkür ederim.

Dr. Şakir Ünal

İÇİNDEKİLER

I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	2
III. GEREÇ VE YÖNTEM	11
IV. BULGULAR	19
V. TARTIŞMA VE SONUÇ	30
VI. ÖZET	36
VII. KAYNAKLAR	40

GİRİŞ

Uzun süre iskemide kalmış dokunun yaşamını tekrar sağlayabilmek için, belirli bir zaman dilimi içerisinde tekrar kan akımının sağlanması lazımdır. İskemi esnasında ATP biter ve metabolitleri birikir. Reperfüzyon aşamasında da bir dizi karmaşık biyokimyasal reaksiyonlar sonucunda ilerleyici mikrovasküler disfonksiyon gelişir ve doku nekrozu meydana gelir. Bu olaya da 'İskemi-Reperfüzyon Hasarı' (İRH) ismi verilmiştir³⁰.

İskemi-Reperfüzyon Hasarı üzerinde birçok çalışma yapılmış olup, bu fizyopatolojik olayın sonuçları engellenilmeye çalışılmıştır. Bu çalışmaların büyük bir çoğunluğunda serbest oksijen radikal oluşumunu veya etkisini azaltmak için, nötrofil göçünün ve adhezyonu önlemek için birçok farmakolojik ve immunolojik ajan denenmiştir⁴¹. Fakat bunların önemli bir bölümünün klinik kullanımı mümkün değildir veya denenmemiştir.

Kademeli reperfüzyon da İRH'ını azaltmak için kullanılan yöntemlerden birisidir. Herhangibir fiziksel ve farmakolojik ajan kullanılmadan yapılan basit bir cerrahi manipülasyon olması nedeniyle diğer yöntemlere göre şanslı gözükmektedir. Fakat üzerinde çok az çalışma yapılmış olup bunlarında çoğunluğu myokard kası üzerindedir^{24,42,51}. Plastik cerrahi literatürdeki tek çalışma Atabay ve ark. tarafından rat adipomuskülokutan kasık flebinde yapılmış ve olumlu sonuçlar rapor edilmiştir². Klinik uygulamaya geçiş için bu yöntemin çeşitli doku ve organlarda araştırılması lazımdır. Bu yüzden biz rat arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde kademeli reperfüzyonun konvansiyonel reperfüzyona göre İRH'ına etkilerini araştırmayı amaçladık.

GENEL BİLGİLER

Uzun süre iskemide kalan dokulara kan akımının tekrar sağlanması ile oluşan doku hasarı çok sayıda disiplin tarafından araştırılmıştır. Rekonstrüktif mikrocerrahide de bu konu halen üzerinde en çok araştırma yapılan ve en önemli problemlerden birisidir. Yeterli akımın sağlanması sonrası reperfüzyon esnasında organ veya dokularda kapiller seviyede kan akımının olmaması "no-reflow fenomeni" olarak isimlendirilmiştir^{3,52}. Ancak sonraki araştırma sonuçları iskemik dokunun reoksijenizasyonu ile birlikte karmaşık bir dizi biyokimyasal reaksiyonların başladığını ve bunun sonucu olarak ilerleyici mikrovasküler hasar ve doku nekrozunun ortaya çıktığını gösterince bu karmaşık olayın adı iskemi-reperfüzyon hasarı olarak değiştirilmiştir³⁰. Patofizyolojisinin aydınlanmaya başlaması ile bu hasarın düşünüldüğünün aksine iskemi dönemine ait olmadığı, reperfüzyon aşamasında meydana geldiği anlaşılmaktadır^{4,30,43}.

İskemi-reperfüzyon hasarı'nın patofizyolojisi için çok sayıda teori öne sürülmüştür.

Bunlar üç ana grupta toplanabilir⁶⁰.

1. Enerji üretiminin bozulması
2. Nötrofil ve mast hücrelerinden serbest oksijen radikallerinin üretimi
3. Yetersiz hücre perfüzyonu (no-reflow fenomen)

1. Enerji üretiminin bozulması.

Doku iskemisi ile birlikte hücrese ATP düzeyinde azalma başlamaktadır. Murry ve ark. iskemi süresinin uzaması sonucu ATP'nin tüketilmesi ve metabolitlerinin birikmesi ile hücrede osmotik basıncın arttığını, ödem, sarkolemma ve sitoiskelet membranında hasar meydana geldiğini, ve bu değişikliklerin irreversibl olduğunu göstermişlerdir³⁹.

2. Nötrofil ve mast hücrelerinden serbest oksijen radikallerinin üretimi

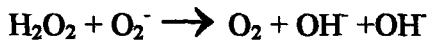
İskemi ve reperfüzyon sırasında oluşan inflamatuvar hücre (nötrofil, mast hücreleri vb.) kaynaklı serbest oksijen radikalleri uzun yıllar İRH'nın en önemli etiyolojik faktörü olarak kabul edilmiştir^{43,58,60,65}. Süperoksit anyon (O_2^-), hidroksi radikal (OH) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest oksijen radikalleri hücre için yüksek derecede toksiktir. Bu radikaller lipid peroksidasyonu sırasında, elektron transferi ile lipid radikallerinin oluşumuna neden olur ve bunu lipid radikallerinin bir seri zincir fragmantasyonu ile küçük yağ asidi zincirlerine dönüşümü takip eder. Serbest radikaller reaktive olarak, hücre duvarı lipid peroksidasyonu, protein enzim denatürasyonu, sarkolemma ve sarkoplazmatik retikulum disfonksiyonuna, geçirgenliği artıran kapiller endotel hasara, damar duvarına trombositlerin ve nötrofillerin yapışmasına yol açarak kalıcı doku yıkımına neden olurlar^{36,38,45,58,65}. İskelet kasındaki reperfüzyon hasarının oksijen radikalleri kaynaklı olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir^{20,35,54,59}. Hücrese solunumla normal olarak üretilen reaktif oksijen türevleri, etkili hücre içi enzimatik sistemlerle rutin olarak uzaklaştırılır. 'Superoxide Dismutase' (SOD) ve 'Catalase' (CAT), in-vivo, dokunun iskemiyeye karşı savaşına çok büyük katkı sağlayan enzimlerdir^{15,25,50}. Buna dokunun anti-oksidan toleransı denir. İRH sırasında ise doğal savunma mekanizmalarını aşan boyutta, fazla

miktarda reaktif oksijen metabolitleri üretilir. Bunu takiben SOD ve CAT enzimleri dokularda kısa sürede tükenir. Oluşan bu fazla miktardaki toksik bileşke hücre zarının lipid fraksiyonunu yaralar, düzenleyici hücresele enzimlele inhihe eder ve DNA halka kırıklıklarına yol açar^{15,16}. Böylesine etkili Süperoksit Anyon oluşumu reoksijenizasyonun ilk 5 dakikasında ortaya çıkar⁵⁷.

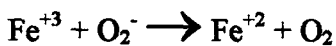
İskelet kasındaki serbest oksijen radikallerinin majör kaynakları

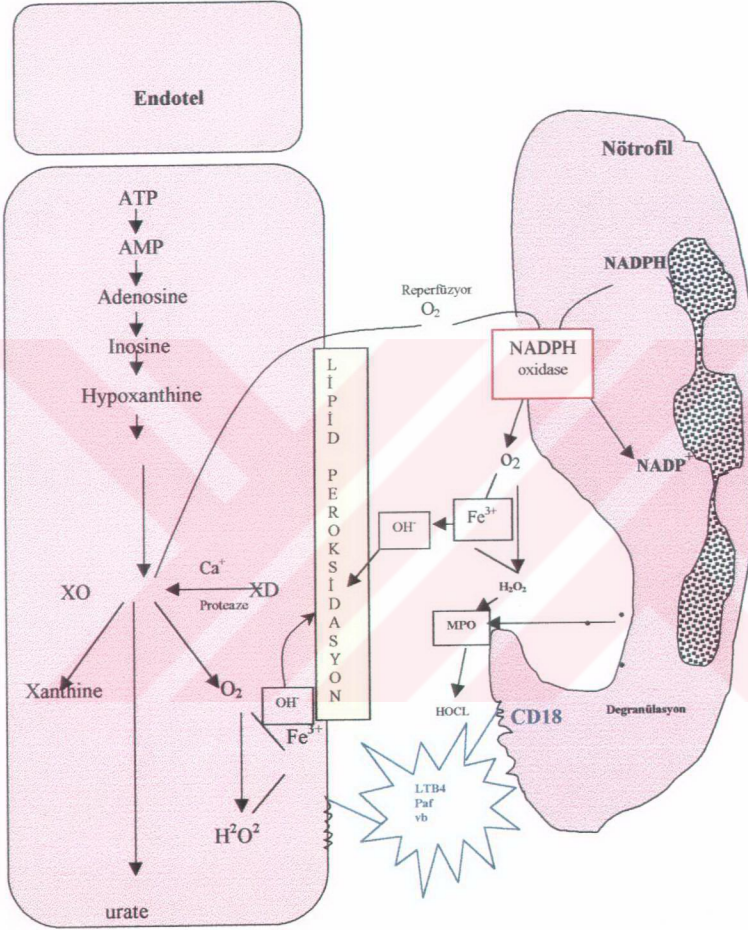
a-Ksantin Dehidrogenaz (XD) ve Ksantin Oksidaz (XO) enzim sistemi

Uzamış iskemi sonrası ATP, hipoksantin'e metabolize olur (Tablo 1). Kanlanması normal olan dokularda XD enzimi hipoksantinden nikotinamid adenin dinükleotit (NAD⁺) ve bir molekül su eşliğinde ürik asit oluşturur. İskemik ortamda ise intraselüler Ca²⁺'un artması ile sitozolik ptoteazı aktive eder⁴⁹ ve XD→XO'a dönüşür. Hipoksantin, XO ile ürik aside çevrilirken oksijen molekülü kullanıldığı için ortama süperoksit anyonlar çıkar. Süperoksit anyonlar (O₂⁻) ise, spontan olarak hidrojen peroksit (H₂O₂) ile reaksiyona girerek, süperoksit anyondan çok daha reaktif olan hidroksil radikali (OH[•]) oluştururlar³⁷.



Haber-Weiss reaksiyonu olarak da isimlendirilen bu reaksiyon normoksik koşullarda çok yavaş ilerlerken, iskemik ortamda katalizör metallerin varlığıyla Fenton reaksiyonu adını alır ve çok hızlı seyreder.





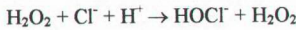
Tablo1: İskemi-reperfüzyon hasarının oluş mekanizması

Hidrojen peroksid orta dereceli bir sitotoksiteye sahiptir ve genellikle antiseptik olarak kullanılır. Hidroksil radikalleri ise oldukça reaktif, güçlü oksidan ve stabil olmayan bir yapıya sahiptir. Protein, polisakkaritler, nükleik asitler, poliansatüre yağ asitleri gibi tüm biyolojik maddelerle reaksiyona girerler. Hücre zarında yüksek konsantrasyonda bulunan poliansatüre yağ asitleri, hidroksil radikalleriyle reaksiyona girdiklerinde lipid peroksidasyonu başlar. Buna bağlı olarak dolaşımdaki fosfolipaz A2 aktivitesi artar. Fosfolipaz A2 hidrolitik bir enzimdir ve hücre zarındaki fosfolipidleri yağ asitlerine yıkarak hücreyi ölüme kadar götürme özelliğine sahiptir

b- Nötrofil NADPH ve MPO enzim sistemleri

Nötrofiller tarafından tüketilen oksijenin yaklaşık % 70'i hücre zarındaki NADPH oksidaz tarafından O_2^- 'e çevrilir. Bu O_2^- , yukarıda tarif edildiği gibi H_2O_2 ve OH^- 'e çevrilir. Bunlarda potent birer sitotoksik ajanlardır³⁷ (Tablo1).

Myeloperoksidaz (MPO) sadece ve bol miktarda nötrofillerde bulunan bir enzimdir. H_2O_2 'yi hipokloroik aside ($HOCl$) çevirir ve bu hidrojen peroksitten yaklaşık yüz kat daha şiddetli hücre hasarı yapabilmektedir⁵³.



Hipoksantin oksidaz sisteminden kaynaklanan serbest oksijen radikalleri moleküler tetikleyici, kalsiyumun hücre içi artışıyla aktive olan fosfolipaz A2 enzimatik tetikleyici dir. Her iki mekanizma sonucunda bölgeye polimorfonükleer (PMN) hücre göçü başlar. Bugüne dek yapılmış çalışmalarda dokuya infiltrate lökositlerin kalp, beyin, barsaklar, iskelet kası, ve kutanöz dokuların İRH'nda etken olduğu gösterilmiştir³³.

İRH'ı, karmaşık olaylardan oluşur ve reperfüze dokuda akut inflamatuvar reaksiyon şeklindedir. Bu akut inflamasyonda yine nötrofiller başrolde ve en önemli komponenti oluştururlar⁹. Endotel hücreleri serbest radikallerde ki hızlı artışa yanıt olarak nötrofiller için spesifik reseptörleri hücre dışına vururlar ve değişik sitokinler salgırlar. Daha sonra nötrofiller hasarlı dokuya taşınırlar. Aktive nötrofiller myeloperoksidaz, proteinaz, lipaz, ve glikozidazları kapsar ve çeşitli bakteriosit ve inflamatuvar mediatörler salgırlar^{9,63}. Bunlar arasında lizozomal kökenli serbest radikaller, araziidonik asit yan ürünleri, proteazlar, sitokinler, ve inflamatuvar reaksiyonu artıracak interlökinler vardır.

3.Yetersiz kas reperfüzyonu (no-reflow)

Uzamiş iskemide reperfüzyon esnasında iskelet kasındaki kan akımı pre-iskemik düzeye ulaşamamaktadır. Revaskularizasyon işleminin başarılı olmasına karşın İRH'nın indüklediği mikrovasküler disfonksiyon uzamiş iskeminin bir sonucudur ve operasyonun başarısız olmasına yol açmaktadır. Endotelial hasar, vasküler düz kas şişmesi, mikrovasküler tromboz, trombosit ve lokosit plakları yetersiz kan akımına neden olmaktadır (no-reflow fenomen)^{32,38,47,58,65}.

Lokal olarak salınan nitrik oksit, lokotrienler, ve prostoglandinler gibi vazoaktif maddeler vasküler düz kas hasarı ve endotelial hasara neden olmaktadır. Kan akımı tekrar sağlandığında, yeterli perfüzyon basıncının tekrar oluşturulmasına karşın kapillerlerin önemli bir miktarı tekrar perfüze olmamaktadır^{3,6,32}.

İskelet kasında ki post-iskemik bir perfüzyon defektine ait ilk tanımlama 1948 yılında yapılmış ve uzun süreli iskeminin iskelet kasının reperfüzyonu esnasında no-reflow fenomeninin gelişmesine neden olduğu ortaya konulmuştur. Daha sonraki çalışmalarda post-iskemik perfüzyon bozukluğunun mikrovasküler yatağa lokalize mekanizmalar ile meydana geldiği ve post-iskemik iskelet kasında iskemi sonrası özellikle büyük damarlar patent kalırken kapillerlerin perfüzyonunun azaldığı gösterilmiştir^{3,28}.

Forbes ve arkadaşları¹² rat iskelet kasında intravital videomikroskopik çalışmasında reperfüzyonun başlamasından hemen sonra perfüze kapillerler sayısında azalma ve postkapiller venülerde lökosit sayısında artma tespit etmişlerdir. 15-20 mikrondan büyük çaplı damarlar patent kalırken, 15 mikrondan küçük mikrodamarlarda perfüzyonun belirgin derecede düştüğünü göstermişlerdir^{27,28}.

Yapışık lökositler tarafından venüler lümenin parsiyel oklüzyonunun bir sonucu olarak, akıma karşı büyük bir vasküler rezistans artışı ortaya çıkmaktadır. Postkapiller venüllerdeki lökosit sayısındaki artış beraberinde doku ödemi ve kapiller dirençte artmaya neden olarak reperfüzyon hasarına büyük ölçüde katkıda bulunmaktadır²⁸.

Reperfüzyon hasarına yol açan mikrovasküler disfonksiyon mekanizmalarını şu şekilde özetleyebiliriz

- lökositlerin arter ve ven duvarına yakın yuvarlanmaları (rolling)
- lökositlerin endotel duvarına yapışması (scrolling-adhesion)
- mikroarteriolar vazokonstriksiyon

Yapılan çalışmalarda iskelet kasındaki 2 saatlik iskemi sonrasında no-reflow gelişebilmekte fakat geçici bir mikrovasküler disfonksiyona neden olduğundan kısa bir süre sonra düzelebilmektedir. 3-4 saatlik bir iskemiden sonra ise ilerleyici bir mikrovasküler disfonksiyon tespit edilmiştir⁴⁶.

İskelet kası reperfüzyon hasarının değerlendirilmesi

İskelet kası, reperfüzyon hasarının tespitinde çeşitli biyokimyasal analiz yöntemleri kullanılmaktadır. Özellikle malonildialdehit (MDA) ve myeloperoksidaz (MPO) aktivitesinin ölçülmesi doku hasarının tespitinde kantitatif değere sahiptir^{8,58}. Lipid peroksidasyonu, lipid hidroperoksitlerinin aldehit, hidrokarbon gazları ve diğer karbonil bileşiklere dönmesi ile sona ermektedir. Bu bileşiklerden birisi olan MDA, lipid peroksit düzeylerinin tespitinde, dolayısıyla serbest oksijen radikali tayininde kullanılan yöntemlerden birisidir. Sadece lökositlerden salınan MPO, lökosit akümülyasyonun spesifik bir göstergesidir. Grisham ve ark. tarafından reperfüzyon esnasında mukozadaki MPO aktivitesinin 18 kat arttığı saptanmıştır¹⁷.

Myeloperoksidaz aynı zamanda , serbest oksijen radikali oluşumuna katkıda bulunan bir enzim olduğu için serbest oksijen radikali tayininde de kullanılmaktadır^{17,31,41,56}.

İskelet kası reperfüzyon hasarının tespitinde, biyokimyasal analiz yöntemleri yanı sıra, histokimyasal boyama, kompüterize planimetri yöntemleri (triphenyltetrazolium chloride, TTC), kas dehidrogenaz aktivitesinin nitrobluetetrazolium (NBT) ile tesbiti, Tc^{99m}-pyrophosphate uptakeinin spektrofotometrik olarak saptanması, nükleer

manyetik rezonans spektroskopisi ile kas dokusunda ATP, laktat, pH değişikliklerinin tespiti vb.kullanılmaktadır^{5,7,22,26}.

Kademeli reperfüzyon

Konvansiyonel reperfüzyonla patlayıcı tarzda hücrel şişme ve geri dönüşümsüz doku hasarı oluşmaktadır. Reperfüzyonu başlangıçta kontrollü yaparak, hiperemik kan akımının engellenmesiyle doku hasarının azaltılabildiği, infarkt bölgesinin, ödemin ve fonksiyonel kaybın daha az olduğu köpek ve domuz koroner arterinde yapılan çalışmalarda gösterilmiştir^{1,40,62}.

Rat adipomuskülokutanöz groin flep modelinde yapılan bir çalışmada 4 saatlik bir iskemiden sonra konvansiyonel yöntemle açılan grupta yaşayan flep yüzdesi 60 iken klempin kademeli olarak açıldığı grupta %99 olarak rapor edilmiştir². Bu çalışmalarda kan akımının kademeli olarak verilmesinin, reperfüzyon hasarına olumlu etkileri rapor edilmiştir.

İskemiden sonra klempin konvansiyonel yöntemle açılmasıyla reperfüzyonun başlangıcında reaktif hiperemik kan akımı meydana geldiği bir gerçektir^{1,2,19,24,40,42,51,62,64}. Kademeli reperfüzyonla hiperemik akım engellenmektedir. Serbest oksijen radikalleri dominant olarak hiperemik oksijenize dokuda meydana geldiği için kademeli reperfüzyonla bu reaktif hiperemik akım önlenmekte ve serbest oksijen radikallerinin azaltılabileceği savunulmaktadır.

Reaktif hiperemik akım intravasküler basınç artışına neden olarak interstisyel bölgeye sıvı geçişine neden olur ve interstisyel ödem oluşturur. Bu interstisyel ödem

reperfüzyonda intravasküler basıncın azalması ile interstisyuma doğru sıvının geçişi azalır ve bölgesel kan akımı dağılımındaki sorun ortaya çıkmaz⁵¹.

Kademeli reperfüzyonun, klinikte akut myokart infarktüsünden sonra perkutanöz koroner revaskülarizasyon ve tromboliziste kullanılabileceği savunulmaktadır.

Koroner revaskülarizasyondan sonra balonun birden boşaltılması yerine kademeli olarak boşaltılması hem kontraktil disfonksiyonu hemde iskemik alanları azalttığı savunulmaktadır²⁴.

Rekonstrüktif mikrocerrahide de kademeli reperfüzyonun uygulanabilmesi için bu çalışmaların artırılması, diğer organ ve dokuların da araştırılması gereklidir. Bu yüzden biz, rat arka bacak flep modelinde kademeli reperfüzyonun, konvansiyonel reperfüzyona göre İRH'a etkilerini araştırmayı amaçladık.

GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Cerrahi Araştırma Merkezi ve Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada ağırlıkları 200-250 g arasında değişen erkek Spraque Dawley tipi 15 adet sıçan kullanıldı

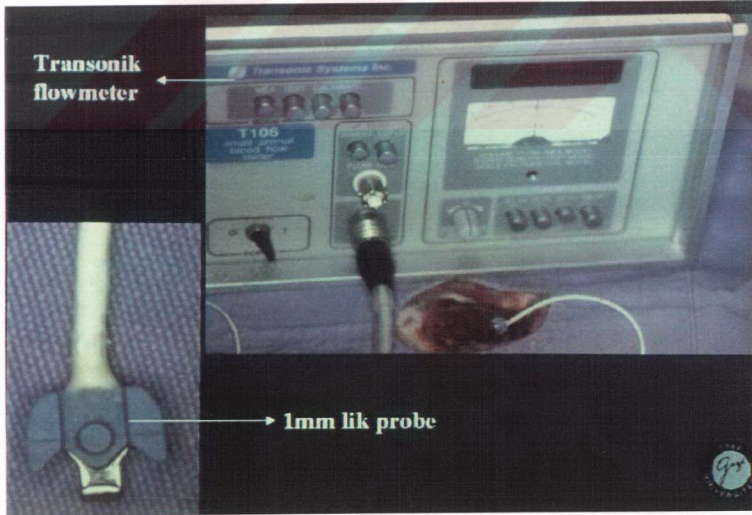
Cerrahi Teknik

Denekler, intramusküler ketamine HCl (50mg/kg) anestezisi uygulanarak uyutulduktan sonra sağ arka bacakları traş edilerek supin pozisyonunda tespit edildi.

Sağ arka bacakta sirkümferansiyel deri insizyonunu takiben, kaslar femoral arter ve ven devamlılığı korunacak şekilde kesildi (Şekil 1). Femura ½ orta seviyeden osteotomi yapıldı^{23,29}. Sonra operasyon mikroskopu (Zeiss, OPMI 9FC) altında standart mikrocerrahi alet ve tekniği kullanarak femoral arter ve ven inguinal ligamandan popliteal bifurkasyona kadar disseke edildi. Femoral arter kan akım hızını ölçmek için "Transonic small enamele blood flowmeter" (T106) den yararlanıldı. Transonic flowmeter'in 1mm'lik probu femoral arter distaline yerleştirildi ve deney sonuna kadar pozisyon değişikliği yapılmadı (Şekil 2). Stabilizasyon için 15 dakika beklendikten sonra pre-iskemik kan akımı 5 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüldü ve ortalaması alındı.



Şekil 1: Femoral arter ve ven devamlılığı korunacak şekilde bacak gövdeden ayrıldı



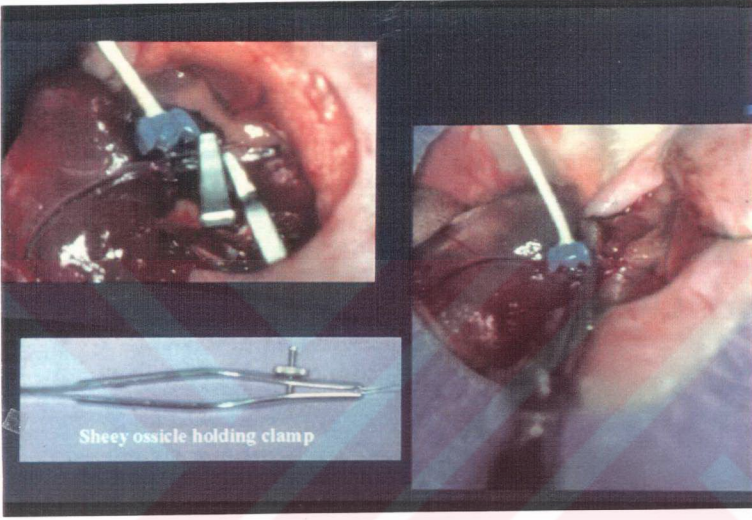
Şekil 2: Transtörük flowmeter ve 1mm'lik probu

Denekler 3 gruba ayrılarak çalışma yapıldı.

Grup 1-Operatif kontrol (n=5): İskemi oluşturulmayan grup

Grup 2-Konvansiyonel açılım (n=5): Femoral arter ve ven'e mikroklemler(A₂,V₂ Acland) konarak 150 dk'lık iskemi başlatıldı. İskemi süresince operasyon bölgesi %0.9'luk serum fizyolojik ile nemlendirildi. İskemiden sonra önce venöz klemp açıldı. Daha sonra arteriyal klemp konvansiyonel yöntemle açılarak iskemi sonrası femoral arter kan akım hızı transonic flowmeter ile 5 dk boyunca ölçülerek kaydedildi.

Grup 3-Kademeli açılım (n=5): Benzer şekilde 150 dk'lık iskemiden sonra önce venöz klemp açıldı. Arteriyal klemp ise modifiye sheey ossicle holding klemp (Storz,N1705150) yardımıyla kademeli olarak açıldı (Reperfüzyon, 30. sn'de ortalama pre-iskemik kanakımının 1/4 ne, 60. sn'de 2/4 ne, 90. sn'de 3/4 ne, 120. sn'de 4/4 ne erişecek ve 13 dakika boyunca da pre-iskemik kan akımının birbuçuk katını geçmeyecek şekilde sağlandı). Daha sonra klemp çıkarıldı (Şekil 3-4).

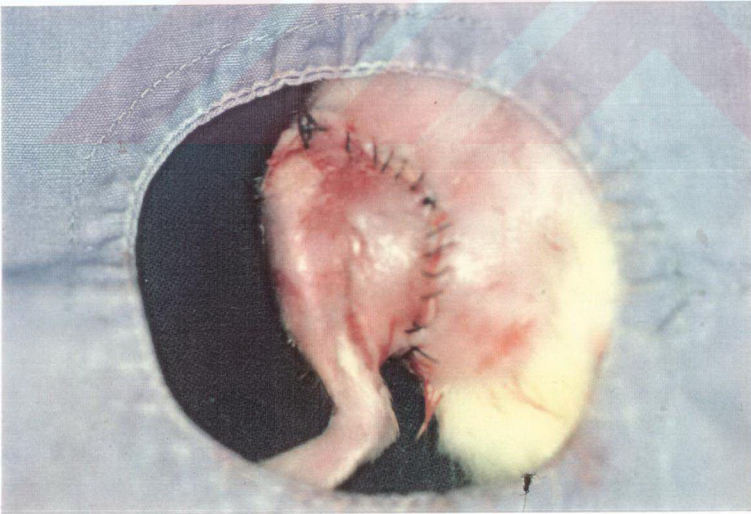


Şekil 3-4: Modifiye sheey ossicle holding klemp yardımıyla kademeli reperfüzyon

Prob çıkartılarak kemik 18 'gauge' enjektör iğnesi ile intramedüller olarak tespit edildi (Şekil 5). Kaslar 5/0 vicryl (Ethicon,W9832) ile onarıldı ve cilt 5.0 ipek (Ethicon,W500) suture ile kapatıldı¹⁷(Şekil 6).



Şekil 5: Kemiğin intramedüller olarak tespiti



Şekil 6: Kas ve cilt tamiri

Ameliyat sonrası denekler tekli kafeslere kondu, uyandıktan sonra su ve gıda alımı için serbest bırakıldı. Reperfüzyonun 24. saatinde benzer şekilde anestezi verilerek tekrar uyutulan denekler, intrakardiyak hava verilerek sakrifiye edildi. Bacak eski insizyon bölgesinden ampute edildi ve soleus kası doku örnekleme için çıkarıldı.

Sıçanlardan alınan kas dokusunun bir kısmı histopatolojik inceleme için %10'luk formaldehit ile tespit edildi. Biyokimyasal inceleme için (MPO ve MDA'nın tespiti) ayrılan kas dokusu ise serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra alüminyum folyoya sarılarak sıvı azotta donduruldu ve ölçüm gününe kadar -70C'deki derin dondurucuda saklandı.

Malonildialdehit (MDA) ölçüm tekniği

Malonildialdehit düzeyi, 1,1,3,3-tetraethoksiopropan'ın standart olarak kullanıldığı tiyobarbitürik asit (TBA) testi yardımıyla, 'TBA reaktive substance' olarak nitelendirilen lipid peroksidleri (MDA), TBA ile girdiği reaksiyon sonucunda oluşan pembe renkli maddenin konsantrasyonun kalorimetrik olarak ölçülmesiyle yapıldı⁶¹.

Myeloperoksidaz(MPO) ölçümü

Myeloperoksidaz enzim aktivitesinin tespiti H₂O₂'nin homojenat tarafından oksitlenerek O₂ dianizidinin redüklenmesi ve redükte O₂ dianizidinin 410nm'de ölçülmesi ile yapıldı¹⁴.

Histopatolojik inceleme

Yapılan çalışmada tüm gruplardaki hayvanlardan alınan kas dokuları %10'luk formalinle tespit edildi. Parafin bloklama yapılarak 5 mikronluk kesitler alındı ve

hematoksilen eozin ile boyandı. İnflamatuar hücre reaksiyonuna, çizgilenme kaybına, nükleus kaybı ve santral nüklelozisyona bakıldı. Bulgular yaygınlığı ve ağırlığına göre semikantitatif derecenlendirildi. Grade I-hafif (1), Grade II-orta (2), Grade III-şiddetli (3) olarak değerlendirildi. Tüm vakaların grade ortancaları alınarak diğer gruplarla istatistiksel olarak karşılaştırıldı.

Sonuçların analizi

Deney sonucunda elde edilen kan akım hızı, MPO ve MDA değerlerinin istatistiksel değerlendirilmesi tek yönlü varyans analizi (ANOVA) ve Duncan testleriyle yapıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı, $p < 0.001$ ise ileri derecede anlamlı olarak kabul edildi.

Histopatolojik değerlendirme non-parametrik değerler içerdiği için Mann Whitney U testi kullanıldı. $p < 0.05$ istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

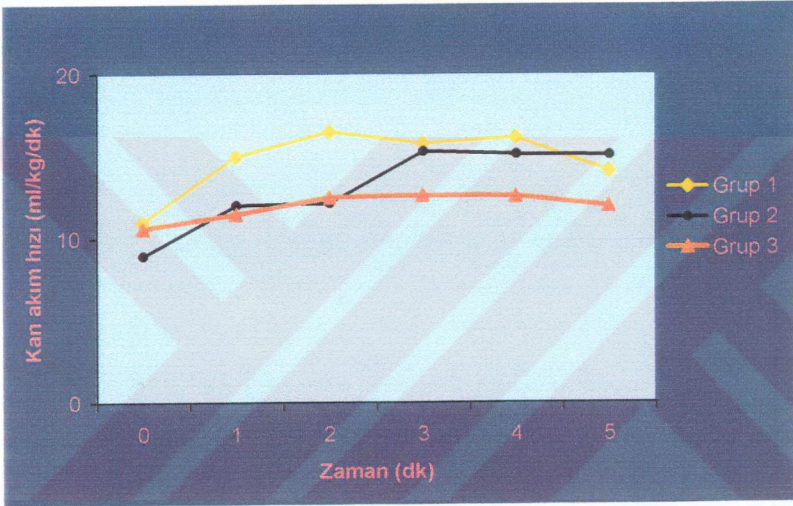
BULGULAR

İskemi öncesi rat femoral arter kan akım hızı (ml/kg/dk)

	Zaman(dk)						Ortalama
	0	1	2	3	4	5	
Grup I-							
1	11,36	12,12	14,02	14,09	14,39	12,88	13,14
2	8,86	13,50	13,50	12,66	13,08	13,51	12,51
3	6,94	7,89	9,15	8,83	9,78	9,46	8,67
4	16,67	26,25	29,27	26,67	27,50	20,83	16,45
5	13,60	14,55	12,67	13,01	14,88	15,22	14,03
							12,95±2,03
Grup II							
1	12,58	16,13	16,13	14,52	13,23	14,52	14,61
2	8,53	8,33	8,33	14,58	14,58	13,12	11,24
3	9,60	9,60	10,00	10,40	10,40	11,20	10,02
4	9,58	11,67	13,23	18,75	19,17	18,75	15,19
5	9,52	14,29	12,86	18,10	18,10	16,19	14,84
							13,21±2,52
Grup III							
1	12,50	20,83	17,08	14,17	8,75	6,25	13,26
2	13,69	12,86	12,45	12,03	14,52	6,22	12,17
3	9,52	9,52	14,29	14,29	14,29	14,29	12,71
4	10,55	10,55	10,55	12,66	12,66	12,13	11,5
5	8,57	8,57	9,15	9,52	9,67	9,52	9,16
							11,72±1,12
Grupların ortalaması							13,16±2,24

Tablo 2: Deneklerin iskemi öncesi kan akım hızı değerleri (ml/kg/dk)

İskemi öncesi rat femoral arter kan akım hızı Grup 1'de $12,95 \pm 2,03$, Grup 2'de $13,21 \pm 2,52$, Grup 3'de $11,72 \pm 1,12$ olarak bulundu. Birlikte değerlendirildiğinde rat femoral arter kan akım hızı $13,16 \pm 2,24$ olarak bulundu (Tablo 2)



Şekil 7: İskemi öncesi kan akım hızlarının gruplara göre dağılımı

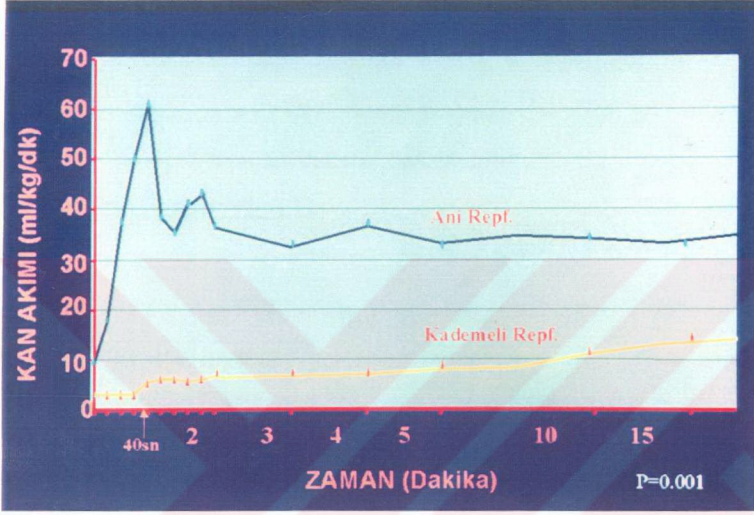
Gruplar arasında iskemi öncesi kan akım hızları açısından anlamlı bir fark yoktu (Şekil 7).

İskemi sonrası rat femoral arter kan akım hızı (ml/kg/dk)

İskemiden sonra klempin konvansiyonel yöntemle açıldığı grupta kan akım hızı başlangıçta tedricen artarak 40.sn'de iskemi öncesinin 5.1 katı kadar yükseklikte maksimuma ulaştı (61,06ml/kg/dk). Daha sonraları 3 katı kadar yüksek seyretti (Tablo 3).

	Zaman											
	sn						dk					
	0	10	20	30	40	50	60	2	5	10	15	
Grup II												
1	8,06	9,68	14,52	16,45	17,10	25,81	33,55	33,87	35,48	33,22	34,51	
2	2,50	14,17	83,33	125,0	166,67	25,42	37,50	34,12	27,50	26,62	27,01	
3	6,40	18,80	23,20	17,60	19,20	18,57	15,20	16,00	36,00	36,88	37,28	
4	18,75	22,92	28,75	30,83	33,75	39,17	38,33	44,58	35,42	35,83	40,88	
5	10,48	23,33	36,67	60,00	68,57	63,33	51,43	33,33	38,10	34,76	35,24	
Ortalama Standart deviasyon	9,24 2,71	17,78 2,62	37,29 12,06	49,98 20,33	61,06 27,96	38,43 8,89	35,20 5,84	32,47 4,61	34,50 1,82	33,45 1,80	34,97 2,25	
	Zaman											
	sn				dk							
	30	60	90	120	5	10	15					
Grup III												
1	3,15	6,27	9,57	13,58	14,10	13,74	15,83					
2	3,04	6,13	9,21	12,15	11,45	12,86	13,56					
3	3,85	7,34	10,32	12,85	13,67	14,98	13,57					
4	2,85	5,89	9,02	11,94	12,34	14,35	14,56					
5	2,41	5,34	7,34	9,25	11,33	12,45	13,56					

Tablo 3: Grup 2 ve 3'ün iskemi sonrası kan akım hızları (ml/kg/dk)



Şekil 8: Grup 2 ve Grup 3'ün iskemi sonrası kan akım hızları

Konvansiyonel açılım ile kademeli açılım grubunun iskemi sonrası kan akım hızları arasındaki fark anlamlı bulundu ($P < 0.001$) (Şekil 8).

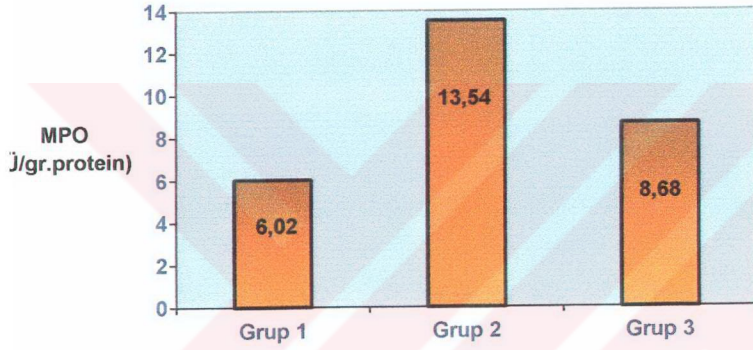
Malonildialdehit (MDA) ve Myeloperoksidaz (MPO) değerleri ve istatistiksel deęerlendirmeleri

Myeloperoksidaz (Ü/gr.protein)

	Myeloperoksidaz (Ü/gr.protein)
Grup I (n=5)	
1	7,44
2	6,51
3	5,21
4	7,58
5	5,28
Ortalama	6,02±2,35
Grup II (n=5)	
1	15,72
2	7,52
3	10,30
4	7,52
5	21,08
Ortalama	13,54±6,09
Grup III (n=5)	
1	7,28
2	10,11
3	5,21
4	8,54
5	12,27
Ortalama	8,68±2,69

Tablo 4: Deneklerin MPO değerleri

Doku myeloperoksidaz enzim düzeyleri Grup 1'de $6,02 \pm 2,35$, Grup 2'de $13,54 \pm 6,09$, Grup 3'de $8,68 \pm 2,69$ Ü/gr.protein olarak bulundu.



Şekil 9:Doku myeloperoksidaz düzeylerinin gruplara göre dağılımı

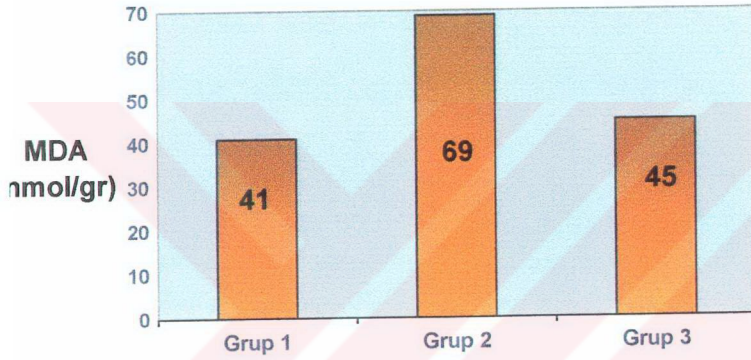
Doku myeloperoksidaz enzim düzeyleri açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Grup 2 ($13,54 \pm 6,09$), Grup 1 ($6,02 \pm 2,35$) ve Grup 3 ($8,68 \pm 2,69$)'den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Malonildialdehit (nmol/gr)

	Malonildialdehit (nmol/gr)
Grup I (n=5)	
1	30
2	11
3	65
4	49
5	51
Ortalama	41±21,7
Grup II (n=5)	
1	49
2	85
3	39
4	108
5	67
Ortalama	69,6±27,7
Grup III (n=5)	
1	72
2	15
3	78
4	34
5	29
Ortalama	45,6±27,8

Tablo 5: Deneklerin MDA değerleri

Doku malonildialdehit düzeyi Grup 1'de $41 \pm 21,7$, Grup 2'de $69,6 \pm 27,7$, Grup 3'de $45,6 \pm 27,8$ olarak bulundu.



Şekil 10: Doku malonidialdehit düzeylerinin gruplara göre dağılımı

Doku malonidialdehit düzeyi açısından gruplar arasında istatistiksel olarak bir fark saptanmıştır ($p < 0.05$). Grup 2 ($69,6 \pm 27,7$), Grup 1 ($41 \pm 27,1$) ve Grup 3 ($45,6 \pm 27,8$)'den istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde yüksek bulunmuştur ($p < 0.05$). Grup 1 ve Grup 3 arasında anlamlı bir fark saptanamamıştır.

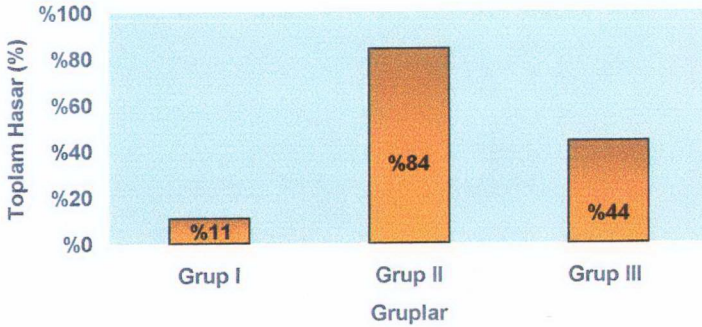
Histopatolojik inceleme

Toplam hasar değerlendirmesi bakımından (maksimum 45) Grup 1'de hasar derecesi (5/45)

%11, Grup 2'de (38/45) %84, Grup 3'de (20/45) %44 olarak bulundu (Tablo 6).

	Grup 1(n=5)	Grup 2(n=5)	Grup 3(n=5)
İltihabi hücre İnfiltrasyonu	2/15	11/15	7/15
Çizilenme kaybı	1/15	13/15	6/15
Nükleus kaybı ve santral nükleololizasyon	2/15	14/15	7/15
Toplam	5/45 (%11)	38/45 (%84)	20/45 (%44)

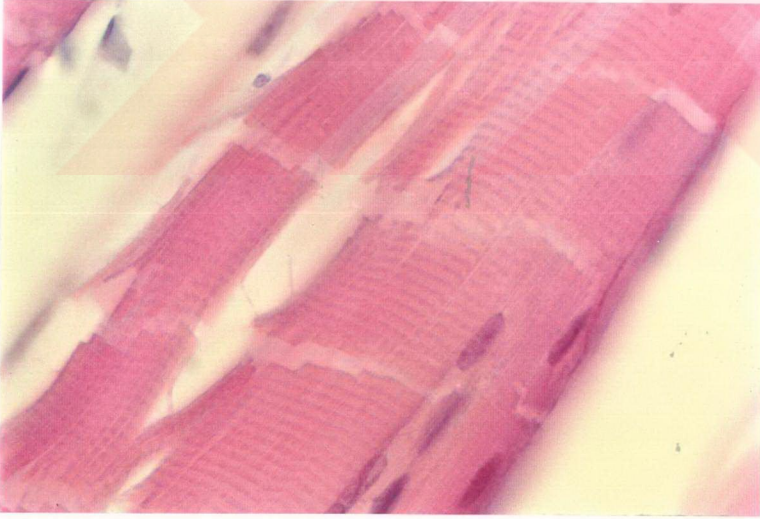
Tablo 6: Grupların histopatolojik değişiklerinin derecelendirilmesi



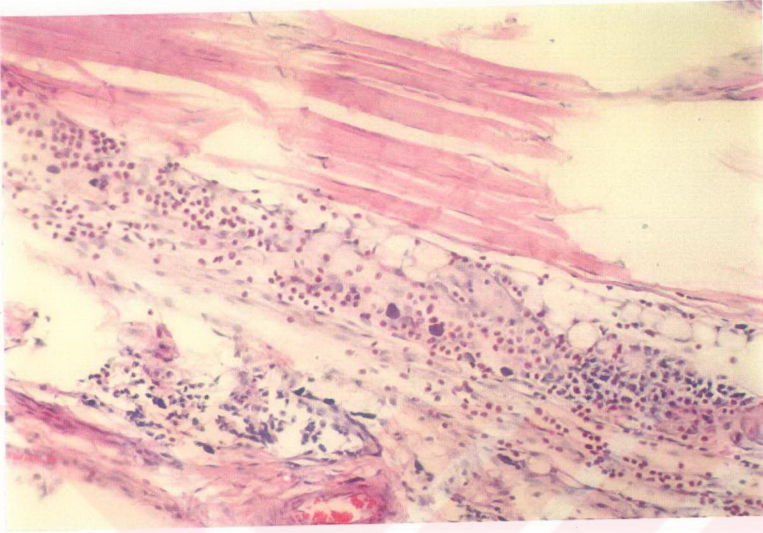
Şekil 11: Grupların toplam histolojik gradeleme skorlarının yüzdeleri

Histopatolojik skorlama yapıldıktan sonra kademeli reperfüzyon grubunda, *iltihabihücre infiltrasyonun ve çizgilenme kaybı*'nın konvansiyonel reperfüzyon grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde daha az olduğu saptandı ($p<0.05$).

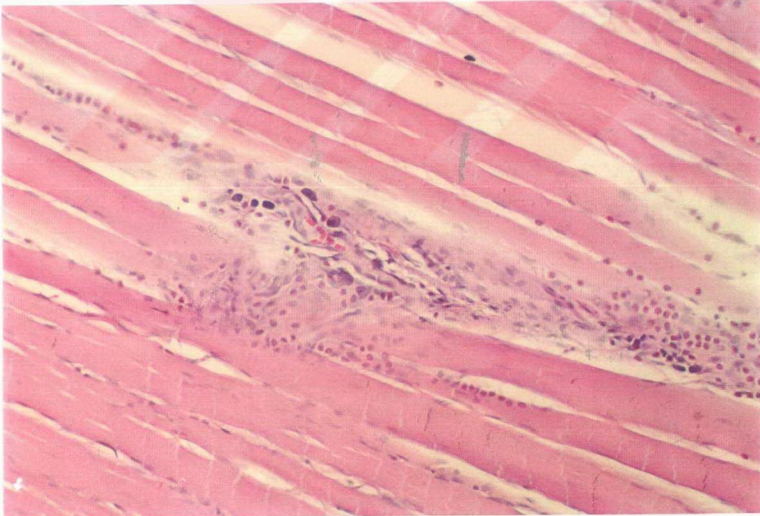
Nükleus kaybı ve santral nükleliolizasyonun ise kademeli reperfüzyon grubunda daha az olmasına karşın konvansiyonel reperfüzyon grubu ile karşılaştırıldığında istatistiksel olarak bir fark saptanmadı.



Şekil 12: Grup 1(400×HE)



Şekil 13: Grup 2 (200×HE)



Şekil 14: Grup 3 (200×HE)

TARTIŞMA VE SONUÇ

İRH'ını önlemek ve/veya azaltmak amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. Bunlar şu şekilde sıralanabilir.

- 1- Farmakolojik ajanların kullanımı
- 2- İmmunolojik ajanların kullanımı
- 3- Cerrahi manipülasyon

Farmakolojik ajanların çoğunluğu serbest oksijen radikal oluşumunu veya etkisini önlemek için kullanılmıştır. Serbest oksijen radikali oluşumunu azaltmak için kullanılan ajanlardan üzerinde en çok çalışma yapılanı ve klinik kullanımı gündeme gelmiş olanı 'Allopurinol'dur⁴⁵. 'Süperoxide Dismutase', 'Catalase', 'Alpha Tocopherol Acetate', 'NO', 'Desferioxamine', 'Ibuprofen', Vitamin C serbest oksijen radikallerin etkisini azaltan ajanlardan bazılarıdır^{15,16,25,30,41}.

İmmunolojik ajanların büyük bir bölümü nötrofil göçünü veya adhezyonu önlemeye yönelik kullanılan ajanlardır. 'Selectin-binding carbohydrate' (fucoidin), dolaşımdan lökosit arındırılması, lökosit infiltrasyonunu önleyici ajanlar, nötrofilsiz kan, nötrofil yüzey immunoreseptörlerine karşı antikolar, PMN'lerin 'cyclophamide' ile arındırılması, yapışma moleküllerine karşı antikolar, 'B-integrins', 'P-selectine', 'E ve L-selectine'den oluşan ilaç karışımları, 'Cyclosporin-A', 'dexamethazone', 'P-Selectin-Ig G', 'Iloprost', 'Leukotrine B4' blokörleri literatürdeki bazı ajanlardır^{21,33,34,35}.

Bu farmakolojik ve immunolojik ajanlarla alınan deneysel sonuçların hemen hemen hepsi olumlu veya anlamlıdır. Ancak önemli bir bölümünün klinik kullanımı mümkün değildir veya denenememiştir.

Cerrahi manipülasyonlara örnek olarakda 'ischemic preconditioning' ve kademeli reperfüzyon gösterilebilir.

1986'da Murry ve ark.³⁹ köpek myokardiyumunda dört siklus 5 dk. iskemi, 5 dk. reperfüzyon sonrası yapılan iskemiden sonra reperfüzyon hasarının azaltılabildiğini göstermişlerdir ve bu olaya da 'ischemic preconditioning' ismini vermişlerdir. İskelet kasında ki 'ischemic preconditioning' mekanizması Adenozin₁ reseptörleri ve ATP-sensitif Potasyum (K_{ATP}) kanallarının aktivasyonu ile oluşmaktadır. İskemi esnasında oluşan enerji depolarının boşalımında ve metabolit birikiminde azalma, reperfüzyon esnasında da nötrofil akümülyasyonunda azalma ve enerji üretiminde artış ile reperfüzyon hasarının azaltılabildiği savunulmaktadır.

Gititkçe artan İRH'ı çalışmalarından elde edilen sonuçlar, iskemi sonrası reperfüzyona bağlı doku hasarının ve no-reflow fenomeninin gelişiminde, lökositlerin anahtar bir role sahip olduğunu göstermektedir^{3,6,10,11,21,32,52}. Reperfüzyon hasarında en erken ortaya çıkan patofizyolojik olaylardan birisi, reperfüze endotelyuma polimorfonükler lökositlerin yapışmasındaki dramatik artıştır ve reperfüzyon sonrası 20.dakikada önemli seviyelere ulaşır. İskemik alanda lökosit akümülyasyonu ile kan akımının ters orantılı olduğu gösterilmiştir¹⁰.

İskemiden sonra kan akımının aniden verilmesiyle oluşan geri dönüşümsüz doku hasarının, 'gentle' reperfüzyonla azaltılabildiği, daha az ödem ve fonksiyonel kaybın daha az olduğu ilk defa 1980'li yıllarda literatüre girmiştir. Daha sonraları 1986'da Okamoto ve ark.⁴⁰

köpeklerde koroner arter by-pass cerrahisinde ani reperfüzyonla 'gentle' reperfüzyon diye tarif ettikleri kontrollü reperfüzyonu karşılaştırmışlardır. Ani reperfüzyonda sistemik perfüzyon basıncı 80mm/Hg iken, kontrollü reperfüzyon grubunda yirmi dakika boyunca 50mm/Hg'nin altında tutmuşlar. Kontrollü açılım grubunda suprapikardiyal ve myokardiyal kaslarda ödemin daha az olduğu ve transmural hemorajinin daha az olduğu gösterilmiştir. Aynı zamanda ATP ve CP seviyelerinin daha az olduğunu göstermişlerdir. Bu bulgularla, kontrollü reperfüzyonun reperfüzyon hasarının azaltılabileceği savunulmuştur.

Chun Fu Pang ve ark.⁴² domuz koroner arterinde, iskemi sonrası hiperemik reperfüzyonla kontrollü reperfüzyonu karşılaştırmışlardır. Kontrollü reperfüzyonu, vasküler klempe monte ettikleri bir mikroşırınga yardımıyla yapmışlardır. Koroner artere elektromagnetik akım probu yerleştirerek de kan akımını ölçmüşlerdir. Ani açılım grubunda hiperemik akımın 2 saatlik reperfüzyon boyunca devam ettiğini görmüşlerdir. Kontrollü açılımı, kan akımını 2 saat boyunca iskemi öncesi değerde tutarak yapmışlardır. Kontrollü reperfüzyon grubunda diastol sonu duvar kalınlığının azaldığı, myokardiyal kalsiyum depolanmasının azaldığı, mitokondriyal oksidatif fosforilazasyon oranının arttığı, myokardiyal ATP içeriğinin arttığı gösterilmiştir.

Masatsugu Hori ve ark.²⁴ köpek koroner arterinde ani reperfüzyonla kademeli reperfüzyonu karşılaştırmışlardır. Kademeli açılımı reperfüzyonun ilk 3 dakikasında koroner perfüzyon

basıncını % 40 civarında, 4-6. dakikalarda % 60, 7-10. dakikalarda %80 civarında tutarak yapmışlar.. Ani reperfüzyon grubunda reaktif hiperemik akımın 15.saniyede pik yaptığını saptamışlardır. Kademeli reperfüzyon grubunda koroner ven'den alınan örneklerde Ph'nın düştüğünü ve fraksiyonel kısalmanın kontrol reperfüzyon grubuna göre belirgin şekilde düzeldiğini göstermişlerdir.

Sato ve ark.⁵¹ köpek koroner arterinde yaptıkları çalışmada kademeli reperfüzyonu, vasküler klempin yavaş yavaş açılması ile 30 dakika boyunca yapmışlardır. Ani reperfüzyon grubunda kan akımının ilk 10 dakika boyunca belirgin şekilde arttığını ve 30 dakikalık reperfüzyon süresince yüksek kaldığını tespit etmişlerdir. Kademeli reperfüzyon grubunda infarkt bölgesi %33 azalırken, paradoksik olarak nötrofil akümülyasyonunun arttığını MPO artışı ile tespit etmişlerdir. Fakat biz çalışmamızda kademeli reperfüzyon grubunda lökosit akümülyasyonun, konvansiyonel reperfüzyon grubuna göre daha az olduğunu tespit ettik. Literatürde Sato ve ark.'nın çalışması haricindeki yayınlarda, nötrofil akümülyasyonu ile reperfüzyon hasarının azalması korelasyon göstermektedir^{42,48,62}. Yazarlar kademeli reperfüzyonda infarkt bölgesinin azalmasını intrakoroner basıncın düşmesiyle vasküler bölgeden interstisyel bölgeye geçişin azaldığı ve interstisyel ödemin azalması ile ekstravasküler baskının ortadan kalkmasına bağlamışlardır.

Kademeli reperfüzyon esnasındaki H⁺ iyonu artışı başlangıçta geçici bir asidoz oluşturur. H⁺, Na-Ca değişimini inhibe ederek, sarkoplazmatik retikulumdan Ca salınımını inhibe ederek ve Troponin C'ye Ca bağlanmasını azaltarak sitozolik Ca artışını engeller⁴⁴. Ca'un azalması kas kontraktilesinde azalmaya neden olacağından, kasın oksijen tüketimi azalır ve ATP içeriği

korunmuş olur²⁴. Konvansiyonel reperfüzyonun başlangıcında kasın oksijen tüketiminde aşırılık vardır. Buda muhtemelen fazla katekolamin salımına veya Ca artışına bağlı olabilir. Kademeli reperfüzyon esnasında aşırı oksijen tüketimi engellenmektedir. Serbest oksijen radikallerinin dominant olarak hiperemik oksijenize dokuda meydana geldiği bir gerçektir^{18,66}. Kademeli reperfüzyonla başlangıçtaki reaktif hiperemik akımın engellenmesi ve oluşan asidoz ile nötrofil aktivasyonun inhibisyonu serbest oksijen radikal oluşumu azaltabilmektedir¹³. Bizim çalışmamızda da serbest oksijen radikali oluşumuna katkıda bulunan ve nötrofil akümülyasyonun bir göstergesi olan myeloperoksidazın ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan malonildialdehitin kademeli reperfüzyon grubunda daha az olması nötrofil aktivasyonun inhibisyonunu ve serbest oksijen radikal oluşumunu azalttığını doğrulamaktadır.

Kademeli reperfüzyon çalışmalarının çoğunluğu kardiyovasküler cerrahlar tarafından yapılmıştır. Palastik cerrahi literatüründe ilk ve tek kademeli reperfüzyon çalışması Atabay ve ark² tarafından rat adipomuskülokutan kasık flebinde yapılmıştır. Kademeli reperfüzyonu Sheey Ossicle Holding klemp yardımıyla, 30.sn'de iskemi öncesi akımın ¼'üne, 60.sn'de ½'ine, 90.sn'de ¾'üne, 120.sn'de 4/4'üne erişecek ve 13 dakika boyunca iskemi öncesi akım hızının birbuçuk katını geçmiyecek şekilde yapmışlardır². Kademeli reperfüzyon grubunda yaşayan flep yüzdesinin belirgin derecede arttığını göstermişlerdir.

Bizde, rat arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde konvansiyonel reperfüzyonla kademeli reperfüzyonu karşılaştırdık. Kademeli reperfüzyonu Atabay ve ark'nın tarif ettiği şekilde sheey ossicle holding klemp yardımıyla 30.sn'de iskemi öncesi akımın ¼'üne, 60.sn'de

$\frac{1}{2}$ 'ine, 90.sn'de $\frac{3}{4}$ 'üne, 120.sn'de $\frac{4}{4}$ 'üne erişecek ve 13 dakika boyunca iskemi öncesi akım hızının birbuçuk katını geçmiyecek şekilde yaptık.

Rat arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde yaptığımız çalışmada konvansiyonel reperfüzyon grubunda oluşan reaktif hiperemik akım, 40.sn'de maksimuma ulaştı ve 15dk'lık reperfüzyon süresince devam etti. Nötrofil akümülayonun spesifik bir göstergesi olan ve serbest oksijen radikal oluşumuna katkıda bulunan MPO ve lipid peroksidasyonun son ürünü olan MDA'nın kademeli reperfüzyon grubunda istatistiksel olarak anlamlı olacak şekilde düşük bulunmuştur.

Bu çalışmada, rat arka bacak iskemi reperfüzyon modelinde, biyokimyasal verilere dayanarak, nötrofil akümülayonun azaltıldığı ve serbest oksijen radikal oluşumunun azaltıldığını söylemek mümkündür. Histopatolojik veriler, hasarın konvansiyonel reperfüzyon yapılan grupta % 84 iken kademeli reperfüzyon grubunda % 44 olduğunu göstermektedir

Kademeli reperfüzyon herhangi bir kimyasal ve fiziksel ajan kullanılmadan yapılan basit bir cerrahi manipülasyondur. Klinik uygulamaya geçiş için çeşitli doku ve organlarda tekrarlanması lazımdır.

ÖZET

Giriş: İskemi-Reperfüzyon hasarından (İRH) korunmak amacıyla, oksijen radikallerini azaltmaya veya kan kompozisyonunu değiştirmeye yönelik deneysel çalışmalar klinik uygulamama bulamamaktadır. Kademeli reperfüzyonun İRH'ına dair çalışmalar genellikle myokart kasında mevcut olup, klinik uygulama açısından basit bir cerrahi manipülasyon olması nedeniyle şanslı görülmektedir. Bu çalışmada rat arka bacak iskemi-reperfüzyon modelinde iskelet kasında kademeli reperfüzyonun reperfüzyon hasarına etkisini araştırmayı amaçladık

Materyal-Metod: Çalışmada 15 adet erkek Wistar tipi rat kullanıldı. Anestezi altında (50 mg/kg Ketaminle) tüm deneklerin sağ arka bacağı, femoral arter ve ven devamlılığı korunacak şekilde gövdeden ayrıldı. 15 dakika stabilizasyon için bekledikten sonra pre-iskemik arteriyal kan akımı transonic flowmeter kullanılarak 5 dakika boyunca her 30 saniyede bir ölçüldü ve ortalaması alındı.

Grup 1-Non-operatif kontrol (n=5): İskemi oluşturulmayan grup

Grup 2-Konvansiyonel Açılım (n=5): 150 dk'lık iskemiden sonra arteriyal klemp konvansiyonel yöntemle açıldı. İskemi sonrası kan akım hızı 15 dk boyunca ölçüldü.

Grup 3-Kademeli Açılım (n=5): 150 dk'lık iskemiden sonra Sheey Ossicle Holding klemp yardımıyla reperfüzyon, kontrollü bir şekilde kademeli olarak açıldı. (30. sn'de ortalama pre-iskemik kan akımının ¼ ne, 60. sn'de 2/4 ne, 90. sn'de ¾ ne, 120. sn'de 4/4 ne erişecek ve 15 dakika boyunca da pre-iskemik kan akımının birbuçuk katını geçmeyecek şekilde tutuldu).

Sonra tamamen açıldı. 24 saat sonra ötenazi uygulanan deneklerin soleus kasından alınan örneklerden histopatolojik (İltihabi hücre infiltrasyonu, çizgilenme kaybı, nükleus kaybı ve internal nüklealizasyon bakıldı) ve biyokimyasal (spektrofotometrik inceleme ile malondialdehit ve myeloperoksidaz) inceleme yapıldı.

Bulgular: Tüm gruplarda iskemi öncesi kan akımı ortalama $13,6 \pm 2,24$ ml/kg/dk bulundu. Klempin konvansiyonel yöntemle açıldığı grupta iskemi öncesi kan akımının 4-5 katı kadar artış saptandı ($61,06 \pm 27,96$). Histopatolojik skorlamada kademeli reperfüzyon yapılan grupta daha az hasar saptanırken biyokimyasal incelemede de kademeli reperfüzyon yapılan grupta malonildealdehit ve myeloperoksidaz düzeyleri daha düşük bulundu.

Sonuç: Bu çalışmada histopatolojik ve biyokimyasal bulgulara dayanarak kademeli reperfüzyonun, İRH'nı azalttığına dair bulgular saptanmıştır. Rekonstrüktif mikrocerrahide kullanılabilmesi için çeşitli doku ve organlarda kademeli reperfüzyonla konvansiyonel reperfüzyonu karşılaştıran çalışmaların yapılması önerilir

SUMMARY

THE EFFECT OF GRADUAL INCREASE IN BLOOD FLOW ON ISCHEMIA-REPERFUSION INJURY IN THE RAT HINDLIMB MODEL

Introduction: Methods for reducing the production of free oxygen radicals and altering the composition of blood in order to prevent ischemia-reperfusion injury have been well-studied; however, they are still far from clinical application. There are studies on the effect of gradual reperfusion on ischemia-reperfusion injury in the myocardial muscle, and it seems to be clinically applicable, since it is a simple surgical manipulation. In this study, we aimed to investigate the effect of gradual reperfusion on ischemia-reperfusion injury in the skeletal muscle, using the rat hindlimb model.

Materials and Methods: Fifteen male Wistar rats were used in three groups. In all groups, the right hindlimb of the animals were detached from the body, leaving the femoral artery and vein intact. Following a 15-minute stabilization period, pre-ischemic arterial blood flow was measured with a transonic flowmeter, in every 30 seconds during the next 5 minutes, and the mean value was taken.

Group I (n=5): Control – The hindlimb of the animals were amputated, leaving the femoral artery and vein intact, but ischemia was not induced.

Group II (n=5): Conventional release of the clamps - Following the stabilization period, microvascular clamps were applied on the femoral artery and vein, and the hindlimbs were subjected to 150 minutes of ischemia. At the end of the ischemic period, the clamps were released at once and post-ischemic blood flow was measured for 15 minutes.

Group III (n=5): Gradual release of the clamps – The ischemia was induced as described in the previous group. At the end of the ischemic period, the arterial clamps were gradually

Group III (n=5): Gradual release of the clamps – The ischemia was induced as described in the previous group. At the end of the ischemic period, the arterial clamps were gradually released by using the Sheey ossicle holding clamp. The clamps were released at a rate that the blood flow velocity would reach to the $\frac{1}{4}$ of the mean pre-ischemic value at 30 seconds, $\frac{1}{2}$ at 60 seconds, $\frac{3}{4}$ at 90 seconds and a similar pre-ischemic value at 120 seconds. The clamps were totally released after 15 minutes of blood flow below the 1.5 fold of the pre-ischemic values.

The animals were euthanized at 24 hours, and samples from the soleus muscle were taken for histological and biochemical evaluation. Histologically, the inflammatory cell infiltration, the loss of the lining and nuclei in the muscle and internal nuclealization was evaluated.

Biochemically, the levels of malonylaldehyde and myeloperoxidase were assessed by spectrophotometric evaluation.

Results: The mean pre-ischemic blood flow velocity was 13.6 ± 2.24 ml/kg/min in all groups. In the conventional release group, the post-ischemic blood flow reached 4 to 5 fold of its pre-ischemic values at 40 seconds (61.06 ± 27.96 ml/kg/min). Histopathological evaluation revealed less damage in the gradual release group comparing to the conventional release group.

Similarly, the malonylaldehyde and myeloperoxidase levels were lower in the gradual release group.

Conclusion: Depending on the histological and biochemical data, we have demonstrated that gradual increase in blood flow reduced the intensity of the ischemia-reperfusion injury in the muscle. Further investigation comparing the gradual reperfusion with the conventional one on various tissues and organs, is required for the future use of this technique in reconstructive microsurgery.

REFERANSLAR

1. Allen BS, Okamoto F, Buckberg GD, Bugyi H, Young H, Leaf J, Sjostrand F, Maloney JV Jr: Studies of controlled reperfusion after ischemia: XV. Immediate functional recovery after six hours of regional ischemia by careful control of conditions of reperfusion and composition of reperfusate. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92:621,1986
2. Atabay K: Is controlled gradual reflow of blood to post-ischemic tissue beneficial for minimizing reperfusion injury. *Plastic Surgery Research Council* 1994
3. Barraso-Aranda J, Schmid-Schönbein GW, Zweifach BW, Engler RL: Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible shock. *Circ Res* 63:437,1988
4. Beyersdort F, Unger A, Wildhirt A.: Studies of reperfusion injury in skeletal muscle preserved cellular viability after extended periods of warm ischemia. *J.Cardiovasc.Surgery* 32:664,1991
5. Blebea J, Kerr J, Shumko JZ, Feinberg RN, Hobson RV: Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *J Surg Resc* 43:311,1987
6. Carden DL, Smith JK, Korthius RJ: Neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle (Role of granulocyte adherence). *Circ Res* 66:1436,1990
7. Cheng HT, Chang H, Lue HJ, Wen CY: Unpredictability of triphenyltetrazolium chloride in staining irreversible ischemia-reperfusion injury in the skeletal muscle of rats. *Eur J Surg* 162:407,1996
8. Cirillo R, Salvatico E, Aliev G, Prosdociami M: Effect of clorricromene during ischemia and reperfusion of rabbit hindlimb:Evidence for an involvement of leukocytes in

reperfusion-mediated tissue and vascular injury. *J Cardiovasc Pharmacology* 20:969,1992

9. Dolan RW, Kerr DC, Arena S,: Improved reflow and viability in reperfused ischemic rat island groin flaps using dexamethasone. *Microsurgery* 16:86,1995
10. Engler RL, Dahlgren MD, Peterson MA, Dobbs A, Schmid-Schönbein GW: Accumulation of polymorphonuclear leukocytes during 3-h experimental myocardial ischemia. *Am J Physiol* 251:H93,1986
11. Engler RL, Schmid-Schönbein GW, Pavelec RS: Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 111:98,1983
12. Forbes TL, Carson M, Harris KA, DeRose G, Jamieson WG, Potter RF: Skeletal muscle injury induced by ischemia-reperfusion. *C J S* 38:56,1995
13. Gabig TG, Bearman SI, Babior BM: Effects of oxygen tension and pH on the respiratory burst of human neutrophils. *Blood* 53:1133,1979
14. Glowick SP, Kaplan SD: *Methods in enzymology* academic press inc. New York. 1955:2:769
15. Godio AS: Oxygen-derived free radicals in plastic surgery: Therapeutic interest of fighting free radicals: superoxide dismutase. *Eur J Plast Surg* 12:111,1989
16. Goosenens D, Rao VK, Harms BA, Starling JR: Superoxide dismutase and catalase in skin flaps during venous occlusion and reperfusion. *Ann Plast Surg* 25:21,1990
17. Grisham MB, McCord JM: Chemistry and cytotoxicity of reactive oxygen metabolite, in Taylor AE, Matalon s, Ward PA(eds): *Physiology of Oxygen Radicals*. Bethesda,MD: *Am.Physiol Soc*, 1986, pp 1-8

18. Gross GJ, Farber NE, Hardman HF, Wartier DC: Beneficial actions of superoxide dismutase and catalase in stunned myocardium in dogs. *Am J Physiol* 250:H372,1986
19. Gürlek A, Schusterman MA, Evans GRD, Gherardini G: Blood flow and microcirculatory changes in an ischemia-reperfusion injury model:Experimental study in the rabbit. *J Reconst Microsurg* 13:345,1997
20. Harris K, Walker PM, Mickle DAG, Harding R, Gatley R, Wilson GJ, Kuzon B, McKee N, Romaschin AD: Metabolic response of skeletal muscle to ischemia. *Am J Physiol.* 250:213,1986
21. Hernandez LA, Grisham NMB, Arfors TKE, Harlan JM, Granger DN: Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. *Am J Physiol* 253:H699, 1987
22. Hickey MJ, Hurley JV, Angel MF, O'Brien BM: The response of the rabbit rectus femoris muscle to ischenia and reperfusion. *J Surg Res* 53:369,1992
23. Hirose J, Yamaga M, Ide J, Tanoue M, Takagi K: Reduced ischemia-reperfusion injury in muscle. *Acta Orthop Scand* 68:369,1997
24. Hori M, Kitakaze M, Sato H, Takashima S, Iwakura K, Inoue M, Kitabatake A, Kamada T: Staged reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs. role of transient acidosis during early reperfusion. *Circulation* 84:2135, 1991
25. Im M.J, Manson PN, Bulkeley GB, Hoopes JE: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 201: 357,1985
26. Jennische E, Hansson HA: Postischemic skeletal muscle injury:Patterns of injury in relation to adequacy of reperfusion. *Exp Mol Pathol* 44:272,1986
27. Jerome SN, Akimitsu T, Korhous RJ: Leukocyte adhesion eudema and development of postischemic capillary no-reflow. *Am J Physiol* 266:H1329,1994

28. Jerome SN, Dore M, Paulson JC, Smith CW, Korthius RJ: P-selectin and ICAM-1 dependent adherence reactions: Role in the genesis of postischemic no-reflow. *Am J Physiol* 266:H1316,1994
29. Kellis G, Shaffer JW, Field G: Development of collateral circulation in a replanted rat hindlimb model. *The Journal Hand Surgery* 16:1070,1991
30. Kerrigan CL, Stotland MA: Ischemic reperfusion injury: A review. *Microsurgery* 14:165,1993
31. Knight KR: Review of postoperative pharmacological infusions in ischemic skin flaps. *Microsurgery* 15:675,1994
32. Korthius RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 254:H823,1988
33. Kubes P, Jutila M, Payne D: Therapeutic potential of inhibiting leucocyte rolling in ischemia-reperfusion. *J Clin Invest* 95:2510,1995
34. Küçükçelebi A, Özcan M: The beneficial effect of cyclosporin-A on the no-reflow phenomenon in rat skin island flaps. *Br J Plast Surg* 45:512,1992
35. Lee C, Kerrigan CL, Tellado JM: Altered neutrophil function following reperfusion and ischemic myocutaneous flap. *Plast Reconstr Surg* 89:916,1992
36. Long JW, Laster IL, Stevens RP: Contractile and metabolic function following an ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: Influence of oxygen free-radical scavengers. *Microcirc Endoth Lymphatics* 5:351,1989
37. McCord JM: The superoxide free radical: Its biochemistry and pathophysiology. *Surgery* 94:412,1983

38. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: Significance of 'reflow paradox.' *Am J Physiol* 263:H1901,1992
39. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings SRB: Ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultrastructural damage during a sustained ischemic episode. *Circ.Res.* 66:913,1990
40. Okamoto F, Allen BS, Buckberg GD, Bugyi H, Leaf J: Studies of controlled reperfusion after ischemia: XIV. Reperfusion conditions: Importance of ensuring gentle versus sudden reperfusion during relief of coronary occlusion. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92:613,1986
41. Pang CY, Forrest CR, Mounsey R: Pharmacologic intervention in ischemia-induced reperfusion injury in the skeletal muscle. *Microsurgery.* 14:176,1993
42. Peng CF, Murphy ML, Colwell K, Straub KD: Controlled versus hyperemic flow during reperfusion of jeopardized ischemic myocardium. *Am Heart J* 117:515,1989
43. Petrasek PF, Homer-Vanniasinkam S, Walker PM: Determinant of ischemic injury to skeletal muscle. *J.Vasc.Surg* 19:623,1994
44. Philipson KD, Bersohn NM, Nishimoto AY: Effects of pH on Na-Ca exchange in canine cardiac sarcolemmal vesicles. *Circ Res* 50:287,1982
45. Picard-Ami LA, Mackay A, Kerrigan CL: Effect of allopurinol on the survival of experimental pig flaps. *Plast Reconst Surg* 89:1098,1992
46. Potter RF, Dietrich H, Tyml K: Ischemia-reperfusion induced microvascular dysfunction in skeletal muscle: application of intravital videomicroscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 13:173,1993
47. Richardson M, Berker A, Roberts A: In vivo microscopy of rat skeletal muscle after ischemia using labeled neutrophils (PMN). *J Surg Res* 53:563,1992

48. Romson JL, Hook BG, Kunkel SL, Abrams GD, Schork MA, Luuchesini BR: Reduction of the extent of ischemic myocardial injury by neutrophil depletion in the dog. *Circulation* 67:1016,1983
49. Roy RS, McCord JM: Superoxide and ischemia: Conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase. In: oxy radicals and their scavengers systems. Vol 2. Cellular and medical aspects. Greenwald RA, Cohen G(ed). New York, Elsevier Science Publishing,1983,s:145-153
50. Sagi A, Ferder M, Levens D, Strauch B: Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoxide dismutase. *Plast Reconstr Surg*. 77:639,1986
51. Sato H, Jordan JE, Zhao Z, Sarvotham SS, Vinten-Johansen J: Gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial injury but augments neutrophil accumulation. *Ann Thorac Surg* 64:1099,1997
52. Schmid-Schönbein GW: Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Federation Proc* 46:2397,1987
53. Schoenberg MH, Beger HG: Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med* 21:1376,1993
54. Sexton WL, Korthius RJ, Laughlin RJ: Ischemia reperfusion injury in isolated rat hindquarter. *J Appl Physiol* 68:387,1990
55. Seyama A: The role of oxygen-derived free radicals and the effect of free radical scavengers on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Surgery Today* 23:1060,1993
56. Sirsjo A, Lewis DH, Nylander G: The accumulation of polymorphonuclear leukocytes in post-ischemic skeletal muscle in the rat, measured by quantitating tissue myeloperoxidase. *Int J Microcirc Clin Exp* 9:163,1990

57. Smith JK, Grisham MB, Aw TY: Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol* 256:H789,1989
58. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korhthius RJ: Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in post-ischemic skeletal muscle. *Am.J.Physiol.*256:H789,1989
59. Strock PE, Majno GM: Microvascular changes in acutely ischemic rat muscle. *Surg Gynecol Obstet* 129:1213,1969
60. Thomas Lee H, Lineaweaver WC: Protection against ischemic-reperfusion injury of skeletal muscle: Role of ischemic preconditioning and adenosine pretreatment. *J Reconst Microsurgery* 12:383,1996
61. Uchiama M, Mihara M: Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Anal Biochem* 86:279,1987
62. Vinten-Johansen J, Buckberg GD, Okamoto F, Rosenkranz ER, Bugyi H, Leaf J: Studies of controlled reperfusion after ischemia: V. Superiority of surgical versus medical reperfusion after regional ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg* 92:525, 1986
63. Weiss SJ.: Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320:365,1989
64. Wright JG, Belkin M, Hobson RW: Hypothermia and controlled reperfusion:two non-pharmacologic methods which diminish ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle. *Microcirc Endothelium Lymphatics* 5:315, 1989
65. Yokata J, Minei JP, Fantini GA, Shires GT: Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. *Am.J.Physiol.* 257:H1068,1989
66. Zweier JL, Flaherty JT, Weisfeldt ML: Direct measurement of free radical generation following reperfusion of ischemic myocardium. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:1404,1987