

59992

T.C.
GAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANABİLİM DALI

**TURNİKE KULLANIMININ NEDEN
OLDUĞU OKSİDATİF STRESİN
ÖNLENMESİ**

UZMANLIK TEZİ
DR. SEZGİN SARBAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞAHAP ATİK

ANKARA-1997

ÖNSÖZ

Turnike, ortopedik cerrahların çok sık kullandıkları bir enstrümandır. Distalinde kalan dokuların kan akımını engellemesi ve altındaki nöromusküler yapılara mekanik etkisiyle; fizyolojik olmayan bir uygulamadır. Ameliyat sonrası morbiditesi yüksek olan bu enstrümanın özensiz ve bilgisiz kullanılması; birçok komplikasyonu da beraberinde getirir. Bu çalışmada turnike kullanımının neden olduğu oksidatif stresin önlenmesinde hipotermi ve ksantin oksidaz inhibitörünün etkileri araştırıldı.

Eğitimime katkılarından dolayı, Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Ortopedi ve Travmatoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Özcan Kaymak'a, klinik öğretim üyeleri Prof. Dr. Şahap Atik'e, Prof. Dr. Haluk Yetkin'e, Doç. Dr. Selçuk Bölükbaşı'na, Doç. Dr. Necdet Altun'a, Doç. Dr. Erdal Cila'ya, Doç. Dr. E. Ertuğrul Şener'e ve Öğ. Gör. Dr. Aykın Şimşek'e, ayrıca tezimin hazırlanması sırasında desteklerini esirgemeyen tez danışmanım Prof. Dr. Şahap Atik'e, Histoloji Anabilim Dalı Başkanı Prof. Dr. Deniz Erdoğan'a, Öğ. Gör. Dr. Suna Ömeroğlu'na, Fizyoloji Anabilim Dalı Öğretim Üyesi Doç. Dr. Lamia Pınar Yanıçoğlu'na, Araş. Gör. Hale Sayan'a ve tüm araştırma görevlisi arkadaşlarıma teşekkürü borç bilirim.

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ.....	1
GENEL BİLGİLER.....	3
GEREÇ VE YÖNTEM.....	21
BULGULAR.....	25
TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
ÖZET.....	40
KAYNAKLAR.....	41

GİRİŞ

Ekstremitelerde cerrahisinde pnömotik turnike geniş kullanım alanı bulmuştur. Kansız bir ortam sağlayarak girişimi kolaylaştırması, kan kaybını azaltması ve ameliyat süresini kısaltması turnikenin avantajlarıdır. Ancak distaldeki nöromusküler yapıların bir süre iskemik kalması ve sonrasında reperfüzyonu, birtakım fonksiyonel ve mikroskopik değişikliklere neden olur^(28,30,50,51).

İskemi -reperfüzyona (IR) maruz kalan kasta, kapiller düzeyde yapısal bozukluklar oluşur. Kapiller geçirgenlik artar, proteinlerin doku aralığına kaçıışı interstisyel ödeme neden olur. Kapiller endoteli iskemide varlığında birçok lokal hormon ve otokoid salgılamından sorumludur. Bunların sonucunda ortaya çıkan proteazlar ve serbest radikaller doku hasarına yol açar^(6,19,20).

İskemik dokunun reperfüzyonuyla, gerekli enerji desteği sağlanır ve toksik metabolitler temizlenir. Bu metabolitlerin sistemik dolaşıma girmesiyle metabolik asidoz, hiperkalemi ve myoglobini/emi oluşabilir^(5,22). Buna karşılık reperfüzyonun, özellikle uzun süre iskemik kalmış dokularda, lokal hasarı artırabildiği belirtilmiştir. Bunun iskemide sonrası oksidatif stresin artmasıyla oluşan serbest radikaller aracılığıyla olduğu bildirilmektedir. İskemide sonrası artan oksidatif stresin önlenmesinde; serbest radikal inaktivatörleri, yapım inhibitörleri, antioksidanlar ve hipotermi birçok deneysel çalışmada kullanılmıştır^(20,41,63,65,66).

Ekstremitelerin turnike uygulamadan önce soğutulması, doku ödemi ve histolojik değişiklikleri azaltır, kas reperfüzyonunu iyileştirir. Metabolik gereksinimi azaltarak, serum myoglobin değişikliklerini sınırlar^(10,24,65,66). Allopürinol, endotelial ksantin oksidazı inhibe

ederek, serbest radikal oluşumunu engeller; doku reperfüzyonu sırasındaki patolojik olaylar zincirini kırar^(25,64).

Bu çalışmada, turnike kullanımının neden olduğu oksidatif stresi önlemede; allopürinol ve hipotermimin ayrı ayrı ve kombine edilerek etkileri araştırıldı. Soleus kaslarından yaş ağırlık, total protein miktarları, doku malonildialdehit (MDA) düzeyi ve total glutatyon ölçümleri yapıldı. Gastroknemius kasından alınan örnekler ultrastrüktürel olarak incelendi.



GENEL BİLGİLER

Pnömotik turnike ilk kez 1904 yılında Harvey Cushing tarafından tanımlanmıştır. Ekstremitte cerrahisinde yaygın kullanımı ise Klenerman'ın 1960'lı yıllardaki çalışmalarıyla oluşmuştur^(13,29,30,31).

Pnömotik turnike; manşon, monometre ve pompa sisteminden oluşan enstrümandır^(7,13). Karmaşık bir düzenek olmamasına karşılık, yetersiz bilgi ve özensiz kullanımla birçok komplikasyona gebebilir. Bu nedenle turnike kullanımı sırasında bazı kurallara uyulmalıdır. Monometre haftada en az bir kez kalibre edilmelidir. Manşon ve pompa sisteminde kaçak olup olmadığı, her kullanım öncesi mutlaka araştırılmalıdır. Manşonu, alta iki kat yumuşak pamuk yerleştirdikten sonra sarmalı ve ekstremitte distalden başlanarak elastik bandajla boşaltılmalıdır^(13,33,38).

Turnike basıncının tam olarak ne olması gerektiği halen tartışmalıdır. Elde edilen bulgular, bugüne kadar gerekenden daha büyük basınçlar kullanıldığı yolundadır. Doğru basınç hastanın yaşı, kan basıncı ve ekstremitenin boyutuyla ilgilidir^(14,31,68). Bazı otörler koldan ölçülen sistolik basıncın üzerine üst ekstremitte için 50-75 mm Hg, alt ekstremitte için 100-150 mm Hg eklerler^(39,44,57,59). Klenerman ise alt ekstremitede; koldan ölçülen sistolik basıncın iki katını kullanmıştır⁽³¹⁾. Crenshaw ve Moore daha geniş turnike manşonu kullanarak, gerekli olan basıncın düşürülebileceğini belirtmişlerdir^(14,43).

Turnike başlangıcı mutlaka not edilmelidir. Basınç göstergesi anesteziistin görebileceği bir yere konmalı ve en küçük basınç oynamaları cerraha iletilmelidir. Süre iki saati geçmemelidir. Eğer daha fazla süre gerekiyorsa ön dakikalık reperfüzyondan sonra işleme devam etmelidir. Ancak toplam süre kesinlikle üç saati geçirilmemelidir^(13,14,51,57).

Turnikeye bağlı komplikasyonlar

Turnikeye bağlı ciddi komplikasyonlar nadir görülmekle beraber, morbiditesi yüksek olan bir uygulamadır^(1,2,11,55,60). Bruner; turnike sonrası gelişen zayıflık, sertlik, ödem, disestezi ve ağrıyla seyreden klinik tabloyu; "post-turnike sendromu" olarak adlandırmıştır⁽⁷⁾.

Turnike boşaltılmasını takiben gelişebilen; masif pulmoner tromboemboli, femoral arteriyel obsbtrksiyon (aterom plağının parçalanması ve tıkaç oluşturmasıyla) ve ani ölümler (metabolik değişikliklere bağlı) nadir rastlanan komplikasyonlardır^(11,55,60). Turnikeye bağlı ağır sinir paralizisi insidansı %0.01 olarak bildirilmiştir^(2,12,16,61). Parestezi ve paraliziye içine alan tüm sinir lezyonları düşünülürse, bu oran 1500-5000 uygulamada bire çıkmaktadır. Lundborg ve Rydevik'in çalışmasında sinir lezyonu gelişen 13 hastada kullanılan turnikelerin 11'de kalibrasyon hatası saptanmıştır. Bu sebeple monometrelerin en az haftada bir kez kalibre edilmesi gerektiğini belirtmişlerdir⁽³⁸⁾.

Nitz ve Dobner'in randomize - prospektif çalışmalarında, turnikeli ameliyatlar sonrasında alt ekstremitede % 70, üst ekstremitede % 77 oranında EMG anormallikleri saptanmıştır. Buna karşın turnike kullanılmadan yapılan ameliyatlar sonrasında bu oranları, sırasıyla % 0.0 ve % 3.4 olarak bulmuşlardır⁽⁴⁷⁾.

Turnikenin anesteziist için önemli sayılabilecek metabolik değişikliklere de yolaçtığı bilinmektedir. Alt ekstremiteye turnike uygulanması kardiyak yüklenmeyi %15 oranında artırır. Bu kalp yetmezliği olan bir hasta için önemlidir. Boşaltmayı takiben, asit-baz dengesinde ve santral venöz basınçta ani değişiklikler oluşabilir^(11,22,29,34,53).

Turnikeyle oluşan kas hasarının mekanizmaları

Turnike; manşonun altındaki ve distalindeki dokuların kan akımını engeller. Az miktarda bir kan akımı intramedüller yolla oluşturulsa da, bu akım aerobik metabolizmanın devamını sağlayamaz. Kısa süreli doku iskemisini reaktif hiperemi ve arteriyel vazodilatasyon izler. 30 dakikadan dört saate kadar süren doku iskemisi sonrası reperfüzyon, doku ödemeine yol açar. Metabolizma anaerobik yollara kaydıkça; oksijen, fosfokreatinin, glikojen ve ATP seviyeleri düşerken; laktat, karbondioksit ve diğer metabolik yan ürünlerin konsantrasyonları artar^(27,29,30,56,62).

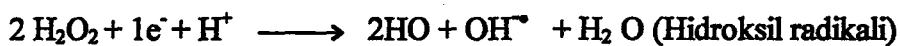
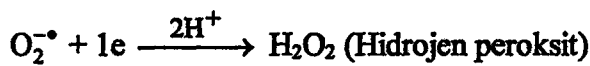
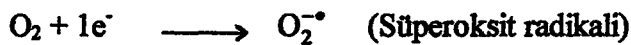
Turnikenin gevşetilmesinden sonraki metabolik iyileşmenin derecesi ve hızı iskeminin süresine bağlıdır. İskelet kasında hücrel metabolik iyileşme bir saatlik iskemiden sonra 5-10, iki saatlik iskemiden sonra 5-20, üç saatlik iskemiden sonra ise 10-60 dakikada olur, dört saatten sonra tam iyileşme olmayabilir^(23,46,57).

İskelet kasının iskemiye duyarlılığı; damarlanmasına ve lif tiplerine bağlıdır. Hızlı (beyaz) kaslar, yavaş (kırmızı) kaslardan daha duyarlıdır. Hızlı kas lifleri geçici iskemiye de duyarlı olabilir^(26,49).

Bir-üç saatlik sürekli iskemi sonrasında iskelet kasının güç üretimi azalır^(9,49). Rat gastroknemius kasında bir saatlik turnike uygulanmasından iki hafta sonra, izometrik güçte belirgin azalma (kontrol kasa göre ~ %66) saptanmıştır. İskemi süresi 4 saat olanlarda bu oran daha da artmıştır^(18,58). Abdel-Salam; turnikesiz total diz protezi uygulanan hastalarda ameliyat sonrası rehabilitasyonun, turnikeli gruba göre daha hızlı ilerlediğini bildirmiştir⁽¹⁾.

Turnikeye bağı iskemi hücre zarında fonksiyon bozukluğuna, iyonik dengenin bozulmasına ve hücre içi kalsiyum artışına yol açar. Hücre içi kalsiyum artışı, fosfolipaz ve proteazları aktive eder. Bu enzimler de sarkolemma ve hücre iskeletine zarar vererek, yapısal bütünlüğü bozar^(34,42,46).

Fonksiyonel ve yapısal mikrovasküler bozukluklar, turnikenin boşaltılmasından sonra akımın olmaması (no-reflow) veya yavaş olmasına yolaçabilir⁽²⁶⁾. 30 dakika - 6 saat sürekli iskelet kası iskemisinden sonra reperfüzyon bozukluğu oluşabilir. Rat tibialis anterior kasında iki saatlik turnike iskemisi sonrasındaki reperfüzyon, bir saatlik iskemiye göre belirgin bozuktur. Bu bulgu turnike basınç hasarlarındaki iki saatlik eşik etkisi ile uyumludur. IR sonrasında iskelet kası ve periferik sinirde mikrovasküler geçirgenlikte bozulma gözlenmiştir. Geçirgenliğin artışı endotel yapısının mekanik etkilerle bozulmasına bağı olabilir. Endotel şişkinliği, doku ödemi ve lökosit değişiklikleri mikrovasküler tıkanıklığı artırabilir^(6,34,64,65). Uzamış iskemi dönemlerinden sonra, doku reperfüzyonu ve moleküler oksijenin hızlı girişi; süperoksit radikalleri ve hidrojen peroksit gibi serbest radikallerin üretimine yolaçar. Serbest radikal oluşumu, hücre zarında lipid peroksidasyonu, glikokaliks yıkımı ve iskelet kasının damar geçirgenliğinin artmasına yolaçabilir. Süperoksitler iskelet kası damar endotelinde, ksantin oksidaz tarafından enzimatik yıkım yoluyla üretilir^(19,69) (Şekil 1).



Şekil 1: Serbest oksijen radikalleri⁽¹⁹⁾

İskemi Reperfüzyon Hasarı

Turnikeye bağlı doku hasarının bir ayağını IR hasarı oluşturur. İskeminin neden olduğu patolojik olaylar özellikle iskemik kalp hastalıkları ve serebral iskemi hem sık karşılaşılan hem de yaşamı tehdit eden durumlardır. İskemi süresi ne kadar uzarsa reperfüzyon hasarı da o derece ağır olur. Reperfüzyon hasarı sonucu oluşan fonksiyonel bozukluklar organdan organa değişiklik göstermekle beraber, hasardan serbest oksijen radikalleri sorumludur^(20,69).

İskemi süresi uzarsa, kapiller dolaşımda tıkaç oluşmasına bağlı reperfüzyon gerçekleşmeyebilir. Bu duruma “akım olmaması” (no reflow) fenomeni denir. 1-3 saatlik kas iskemisi sonrası reperfüzyonda sorun olmazken, 5 saatlik iskemi sonrası %40-50 kadar alanda akım olmaması fenomeni gözlenebildiği belirtilmiştir^(6,40,41,69).

İskemi sırasında hücre içinde aerobik metabolizma hızla anaerobik metabolizmaya dönuşür. ATP, ADP gibi yüksek enerjili fosfatlar birkaç dakika içinde yıkılırlar ve hücrede protonlar, laktat ve inorganik fosfatlar birikir. Hücre içi asidozisi, $Na^+ - K^+$ ATPaz gibi hücre içi iyon dengesini sağlayan pompaların bozulmasına neden olur. İskemi sırasında hücre içine kalsiyum girişinin artması endojen fosfolipazların aktive olmasına ve hücre membran bütünlüğünün bozulmasına neden olur. Endotel hücresinde membran bütünlüğünün bozulması komplemanı aktive eder. Bu da lökositlerin endotel hücresine adezyonunu kolaylaştırır. Membran bütünlüğünün bozulması ayrıca hücre içinde bulunan süperoksit dismutaz, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi antioksidan enzimlerin kaybını da hızlandırır. Bu durumdaki hücre, reperfüzyon sırasında oluşumu artan oksijen radikallerinin etkisine, daha duyarlı hale

gelir. Bu nedenle iskemi ne kadar uzunsa meydana gelen reperfüzyon hasarı o derece ciddi olmaktadır^(19,20,50,69).

Reperfüzyon sırasında artan serbest oksijen radikali kaynakları doku veya organa göre değişmekle beraber başlıca şunlardır:

Katekolaminler: İskemik bölgede sempatik sinir son uçlarından salınan norepinefrin monoamin oksidaz enzimi tarafından yıkılırken elektron akseptörü olarak oksijen kullandığından, hidrojen peroksit ve hidroksi radikalleri oluşur. Bu yolla oluşan serbest oksijen radikallerinin miktarı çok azdır⁽²⁰⁾.

Mitokondri: Hücresel oksidasyon reaksiyonlarının gerçekleştiği mitokondride moleküler oksijenin suya redüksiyonu sırasında normalde %1 oranında serbest oksijen radikali oluşur. Ancak iskemi sırasında bozulan mitokondriyal enzim fonksiyonları nedeniyle bol miktarda serbest oksijen radikali ortaya çıkar. Bu yolla oluşan oksijen radikali miktarının özellikle iskemi sırasında önemli olduğu gösterilmiştir^(20,69).

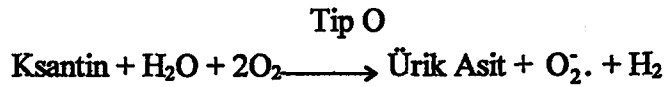
Serbest yağ asidi metabolitleri: İskemi sırasında bozulan ATP bağımlı iyon pompaları nedeniyle hücre içine kalsiyum, sodyum ve klor iyonları girişi artarken potasyum iyonu miktarında azalma meydana gelir. Özellikle iskemi sırasında artan kalsiyum iyonu girişi fosfolipaz C'nin aktivasyonu ile membrandaki serbest yağ asidlerinin yıkımına neden olur. Alternatif bir yol olarak iskemi direkt olarak 3', 5' siklik adozin monofosfat (cAMP) bağımlı fosfolipaz A'nın aktivasyonu ile potasyum, adozin ve katekolamin salınımını artırır. İskemi sırasında serbest yağ asidi yıkımı ile artan araşidonik asit reperfüzyon sırasında lipooksijenaz ve siklooksijenaz enzimleri aracılığıyla prostaglandin ve tromboksanları oluşturken süperoksit üretimine de neden olur^(20,64,96).

Lökositler: Lökositler iskemi sırasında oluşan membran hasarı nedeniyle kolaylıkla endotel hücrelerine adeze olurlar. Ayrıca salgıladıkları fosfolipaz enzimi ile hücre membranında da hasar oluşurlar. Myokard iskemisi sonrası kapiller tıkaçlar aracılığı ile “no reflow” fenomeninin oluşmasına katkıda bulunurlar. Diğer yandan içerdikleri NADPH enzimi yoluyla bakterisidal aktivitede önemli yeri olan süperoksiti oluştururlar. İskemi sırasında oluşan kemoreaktan maddeler nedeniyle endotel hücrelerine adeze olan ve büyüklükleri ile kapiller tıkaçta yolaçan lökositler ürettikleri serbest oksijen radikalleri yardımıyla reperfüzyon hasarında önemli yere sahiptirler (reflow paradox)^(49,64).

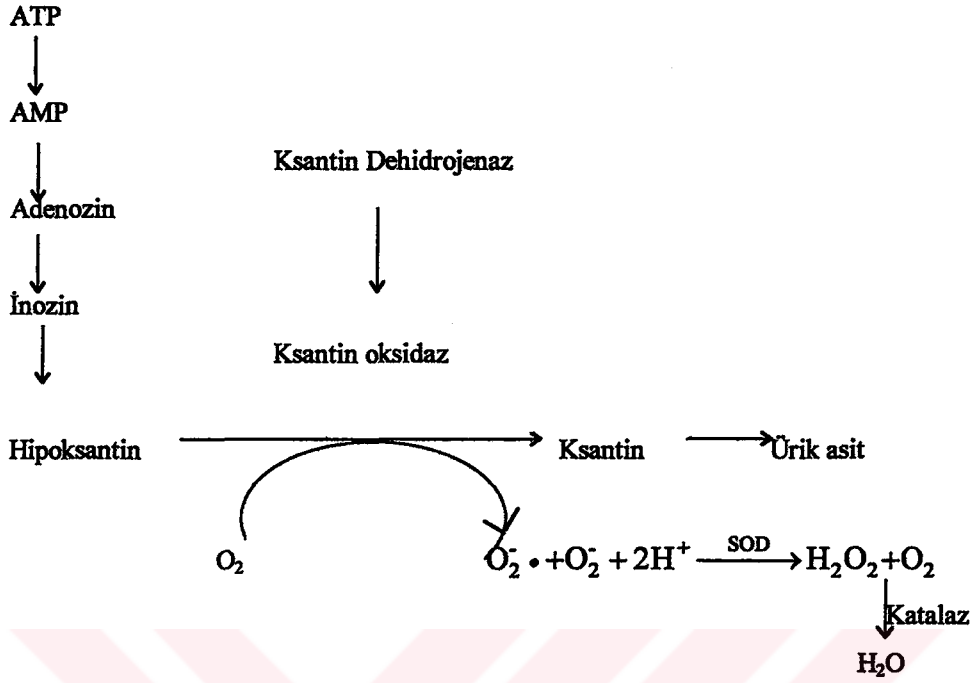
Ksantin oksidaz: Endotel hücresinde önemli bir serbest oksijen radikali kaynağıdır. Ksantin dehidrogenaz (Tip D) olarak sentezlenen enzim NAD'nin redüksiyonu ile ksantinin ürik asite dönüşümünü sağlar.



Ksantin oksidaz enzimi (Tip O), O₂'yi kullanarak süperoksit radikali oluşumuna neden olur.



İskemi sırasında yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımının artışı ile hücrede ksantin ve hipoksantin birikmektedir. Bu sırada hücre içine kalsiyum girişi ile Ca⁺⁺ - proteaz aktivitesinin artışı, Tip D'nin Tip O'ya dönüşmesine neden olmaktadır. Böylece reperfüzyon sırasında ortamda O₂'nin artması ile hipoksantin ve ksantin ürik asite yıkılırcan bol miktarda süperoksit oluşmaktadır^(25,48,69) (Şekil 2).



Şekil 2: IR sırasında süperoksit oluşum mekanizması⁽⁴⁸⁾

Serbest oksijen radikallerinin hasar oluşturma mekanizmaları:

Serbest oksijen radikalleri hücrede lipidler, proteinler, DNA üzerinde toksik etkiye sahiptirler. Bu yolla hücrede yapısal ve fonksiyonel bozukluklara neden olabilirler^(15,19,20,69).

Lipid peroksidasyonu: Biyolojik hasarla karakterize radikal reaksiyonlarından en iyi bilinenidir. Hücre membranları; poliansatüre yağ asitleri ve fosfolipidlerden oluşmuştur. Peroksidasyona en duyarlı olanlar poliansatüre yağ asitleridir. Radikal yağ asiti yan zincirindeki karbon atomlarından birinden bir hidrojen koparır. Karbon merkezli bir radikal oluşur. Radikal oksijen ile birleşerek peroksi veya peroksil radikali oluşturur. Bunlar da başka yağ asiti yan zincirleriyle reaksiyona girip lipid hidroperoksitleri oluştururlar. Hidroperoksitler yüksek derecede toksik ürünler vererek dekompoze olabilirler. En toksik ürünler aldehidlerdir. Daha sonra göreceli olarak stabil olan son ürün malonildialdehit oluşur. Bu, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak kullanılabilir.

İki lipid radikali yan yana gelirse kovalan bağlar, çapraz bağlar oluşur. Reaksiyon membran proteinleri ile de olabilir. Tüm biyolojik membranlar lipid peroksidasyonuna duyarlıdır. Geçirgenlik değişikliklerinden başlayarak, membranda yapısal ve fonksiyonel bozukluklara yolaçabilir^(15,19).

Plazma lipoproteinleri ve özellikle düşük dansiteli lipoproteinler de oksidasyona uğrayabilirler. Okside lipoproteinler hücre fonksiyonlarının bozulmasına aracılık edebilirler⁽¹⁹⁾.

Proteinler üzerine etkiler: Serbest radikaller proteinleri de etkiler. Etkilenme dereceleri amino asit kompozisyonlarına bağlıdır. Doymamış ve sülfür içeren moleküllerin serbest radikallere duyarlılığı çok fazladır. Sistin, sistein, histidin, metiyonin, triptofan ve tirozin içeren proteinler oksidanlara en duyarlı olanlardır^(20,25).

Serbest radikaller amino asitlerin oksidasyonu yanında, peptid bağlarının hidrolizi, disülfid bağları oluşumu ve çapraz bağlanmalara yol açabilirler. Bunun sonucunda, enzimler fonksiyon kaybına uğrayabilir. Örneğin Ca^{++} -ATPaz ve Na^{+} - K^{+} ATPaz tiyol gruplarının oksidasyonu ile aktivite kaybına uğrarlar. Hücre içi ve dışı iyon dağılımı bozulur. Ciddi hücre hasarlanması olabilir^(15,17,69).

Özellikle hidroksil radikali olmak üzere serbest radikaller nükleik asit bazlarının modifikasyonu ve DNA şeridi kırılmasına neden olurlar. DNA polimerazı inhibe ederler. Karsinogenezis, hücre yaşlanması ve hücre ölümlüne kadar giden süreçleri başlatıp ilertebilirler^(20,69).

Turnikeye bağlı sinir hasarı:

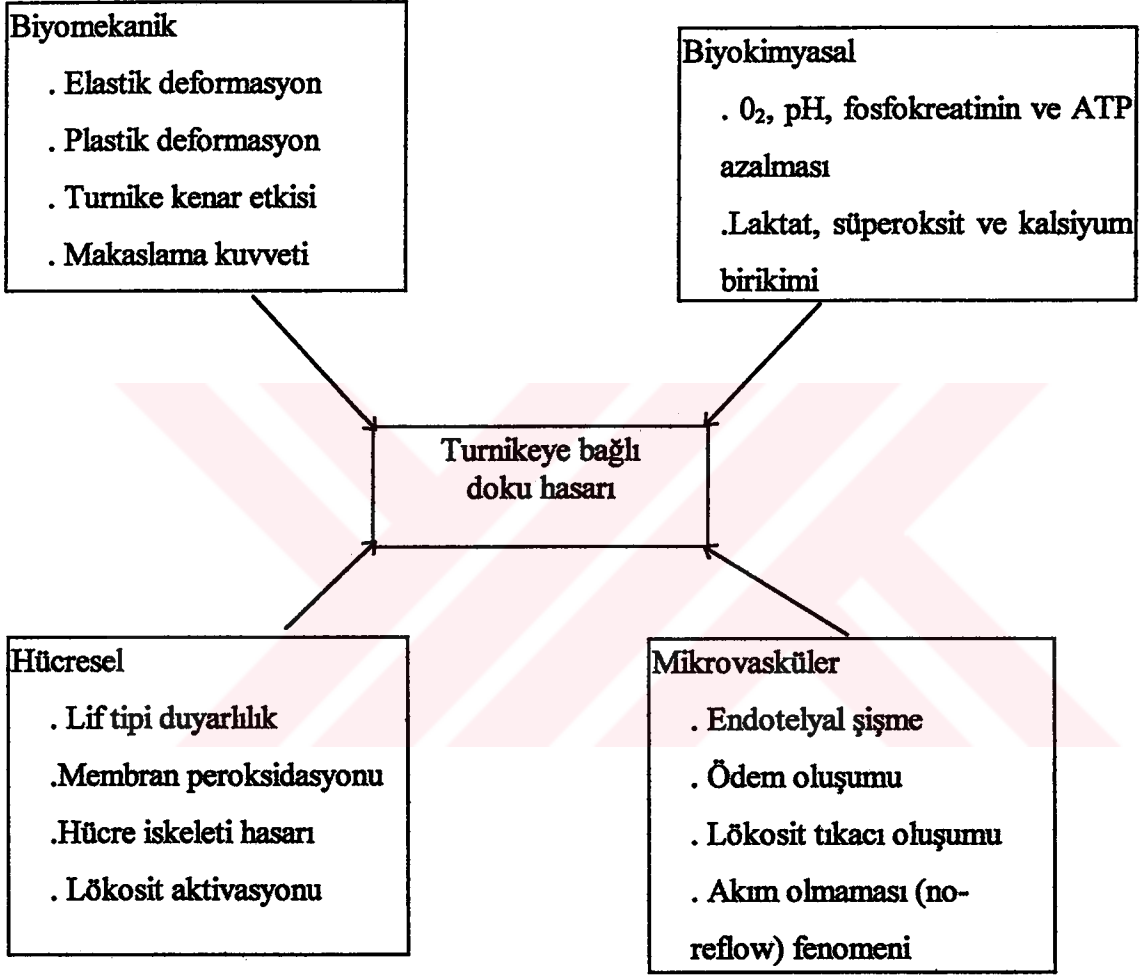
Turnike iskemisine maruz kalan periferik sinirlerdeki fonksiyonel ve yapısal değişiklikler iyi tanımlanmıştır. 15-45 dakikalık turnike uygulaması ile genellikle tam iletim bloğu ortaya çıkar. İki saatin altındaki turnike sürelerinden sonra; 2-30 dakika içinde sinir iletimi normale döner. Altı-sekiz saatlik turnike uygulamasından sonra kısmi iyileşme olurken, on saatlik sinir iskemisi sonrası hiç iyileşme olmayabilir^(8,37,54).

Dört-altı saatlik turnike iskemisinden sonra periferik sinirlerde dejeneratif değişiklikler olur. Nitz ve Dobner turnike baskısının mikrovasküler geçirgenliği ve intranöral ödem oluşumunu artırarak, kalıcı doku iskemisi ve sinir dejenerasyonuna yolaçtığını belirtmişlerdir⁽⁴⁷⁾. Periferik sinirlerin akut baskılanmasıyla intranöral mikrovasküler anormallikler ve ödem oluşması bu hipotezi desteklemektedir. Sinirin bası altında kalması endonöral sinir basıncını artırarak lokal doku beslenmesini daha da bozar. Böylelikle bir kısır döngü; basınç - ödem - beslenme bozukluğu - artmış ödem, ortaya çıkar^(8,37,54).

Basıya bağlı sinir patolojisinde ödem oluşumunun etyolojisi tam olarak anlaşılamamıştır. Mekanik zedelenme endotel hasarına yolaçarak protein geçirgenliğini artırır. Mast hücreleri mikrovasküler bozukluğa katkıda bulunabilir. Lökositlere bağlı süperoksit yapımı da geçirgenlik artışına neden olur^(37,59).

Bazı araştırmacılar turnike uygulamasının iskelet kasında periferik sinirden daha fazla hasar oluşturduğunu düşünürken, diğerleri sinirin kastan daha fazla etkilendiğine inanmaktadırlar. Bazı otörler ise nöromusküler bileşkenin iskemiyeye en duyarlı bölge olduğunu bildirmişlerdir^(8,9,57,70).

Turnikeye bağlı n6romusk6ler hasarın mekanizması karmaşıktır. Biyomekanik, biyokimyasal, mikrovask6ler ve h6creler mekanizmaları; bu hasarın oluşmasında etkilidir.⁽⁵⁰⁾ (şekil 3).



şekil 3: Turnikeye bağlı n6romusk6ler hasarın mekanizması⁽⁵⁰⁾

Turnike basıncıyla oluşan makaslama kuvveti, alttaki dokularda elastik (geçici) veya plastik (kalıcı) deformasyon oluşturabilir. Pedowitz ve ark. bu etkinin d6z pn6motik turnikelerle daha fazla olduğunu ve ekstremit6 y6zeyine tam oturan konik turnikelerin kullanımıyla makaslama kuvveti ve turnike kenar etkisine bağlı zararların azaltılabileceğini belirtmişlerdir.^(50,52)

Turnike distalinde kalan dokulardaki biyokimyasal değişiklikler iyi tanımlanmıştır. Benzer değişiklikler turnike altındaki dokularda da beklenir. İskemi sırasında, hücreler anaerobik yola kaydığından; O₂, ATP, fosfokreatinin ve glikojen düzeyi azalırken, kas yaş ağırlığı, malonildialtehit, laktat, süperoksit ve kalsiyum düzeyleri artar^(19,20,64).

İskemi-reperfüzyon hasarına karşı savunma mekanizmaları

Hücreler oksidatif harabiyeti önleyen, sınırlayan ya da kısmen tamir eden endojen koruyucu mekanizmalara sahiptirler. Ayrıca birçok ilaçların da değişik yollarla doku hasarını önlemede etkili olduğu gösterilmiştir (Tablo-I)⁽²⁰⁾.

Tablo I. İskemi - reperfüzyon hasarına karşı savunma mekanizmaları

		<u>Etki Mekanizmaları</u>
A. Serbest radikal inaktivatörleri:		
Katalaz*	}	Süperoksit ve hidrojen peroksit inaktivasyonu
Süperoksit dismutaz*		
Glutasyon peroksidaz *		
Nafazatrom		
Mannitol	}	Hidroksi radikal inaktivasyonu
Dimetiltiyotre		
Dimetilsülfoksit		
Merkaptopropiyonil glisin		
Histidin*		Tek oksijen inaktivatörü
B. Serbest radikal yapım inhibitörleri:		
Alloptürinol	_____	Ksantin oksidaz inhibitörü
Desferoksamin	_____	Demir bağlayan ajan
C. Lökosit inhibitörleri:		
Adenozin	_____	} Süperoksit yapımını engeller } Lökosit adezyonunu inhibe eder.
Tranforme eden büyüme faktörü - β (TGF- β)	_____	
CD11 - CD18 kompleksine karşı monoklonal antikorlar	_____	
Antiproteazlar	_____	
Perflorokimyasallar	_____	Lökosit proteaz aktivitesini inhibe eder.
		Lökosit kemotaksisini ve lizozim
D. Antioksidanlar		
Vit-E (α -tokoferol) *	}	Peroksidasyonu engellerler.
β -karoten		
Propranolol		
Kalsiyum kanal blokerleri		
Kaptopril		
Nafazatrom		
E. Hipotermi	_____	Metabolizmayı yavaşlatır.

* Endojen mekanizmalar

A. Serbest radikallerin inaktivasyonu

Hücrede oluşan radikallerin inaktivasyonu başlıca enzimattiktir (intraselüler enzimattik antioksidan savunma). Antioksidan savunmanın önemli bir kesimini süperoksit ve hidrojen peroksiti temizleyen spesifik enzimler oluşturur. Bunlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx) enzimleridir^(15,22,35).

SOD, süperoksitin hidrojen peroksite dismutasyonunu katalize eden bir metalloenzimdir.

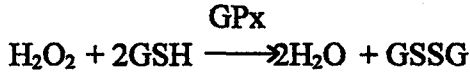


Memeli hücrelerinde bakır-çinko ve manganez içeren iki tipi vardır. Sitozolde ve mitokondri intermembranöz kesiminde Cu-Zn SOD enzimi bulunur. Mn formu mitokondrial matrikste ve kısmen sitoplazmada fonksiyona sahiptir^(19,22).

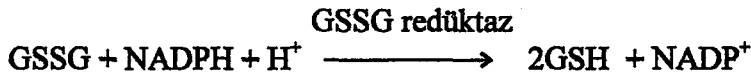
Süperoksit radikallerinin dismutasyonu ile ya da direkt olarak oluşan H_2O_2 , katalaz ve glutatyon peroksidaz emzimleri tarafından suya dönüştürülerek detoksifiye edilir.

Katalaz, konsantrasyonu değışmekle birlikte bütün hücre tiplerinde bulunan bir hem-enzimdir. Sitozolde ve daha çok peroksizomlarda lokalizedir. Katalaz; peroksidatik yada kalalitik reaksiyonlarla, hidrojen peroksiti suya dönüştürerek temizler^(20,35).

Normal koşullarda hücrede oluşan H_2O_2 'in detoksifikasyonunda esas olarak bir selenoenzim olan GPx fonksiyona sahiptir. Glutatyon peroksidaz da H_2O_2 'i katalitik reaksiyonla redükte eder. Bu reaksiyonda redükte glutatyon (GSH) işleve sahiptir. Sonuçta okside glutatyon disülfit (GSSG) ve su oluşur⁽¹⁹⁾.



Antioksidan etkinliğin devam edebilmesi için okside glutatyonun tekrar redükte forma dönüştürülmesi gereklidir. Bu işlem NADPH bağımlı bir enzim olan glutatyon redüktaz tarafından yerine getirilir^(19,20).



NADPH'nın rejenerasyonu için glüköz-6-fosfat dehidrogenaz enzimi gereklidir. Dolayısı ile glutatyon, glutatyon redüktaz ve glukoz-6-fosfat dehidrogenaz da hücre içi antioksidan savunmada işleve sahiptirler^(20,35).

Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimleri, hücre içi H_2O_2 konsantrasyonu düzenlenmesinde önemlidir. Düşük H_2O_2 düzeylerinde GPx etkinken, katalaz daha çok H_2O_2 oluşumunun arttığı durumlarda görev alır. GSH yeterli düzeyde olduğu zaman her iki enzim de H_2O_2 'i benzer hızda redükte ederler. Katalazın daha çok peroksizomlarda, glutatyon peroksidazın sitozol ve mitokondride lokalize olması nedeniyle hücre içi H_2O_2 konsantrasyonu düzenlenmesinde kollabere bir etkinlik gösterdikleri de ileri sürülmektedir^(15,20).

GSH'ye dayalı antioksidan savunma aktivitesi sadece H_2O_2 detoksifikasyonu ile sınırlı değildir. CAT'dan farklı olarak GPx hidroperoksitleri de redükte edebilir.

Ekstrasellüler kompartmanda H_2O_2 'i temizleyen (redükte eden) enzim sistemleri yoktur. Ekstrasellüler H_2O_2 'in dolaşımdaki eritrositler tarafından metabolize edildiği kabul edilir.

Dimetiltiyötre, dimetilsülfoksit, merkaptopropionil glisin ve mannitol; hidroksi radikalini inaktive ederler. Histidin ise tek oksijeni tutar⁽²⁰⁾.

B. Serbest radikal yapım inhibitörleri: Endotelyal ksantin oksidaz enziminin iskemik hallerde arttığı bilinmektedir. Allopürinol, hipoksantin yapısal analogudur. Ksantin oksidazı kompetitif olarak inhibe ederek, süperoksit anyon yapımını engeller.

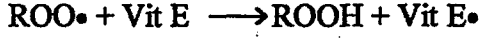
Desferoksamin güçlü bir demir bağlayıcı ajandır. Demir, Haber-Weiss reaksiyonu ve hidroksil radikali üretimi için gereklidir. Demirin, bağlanmasıyla bu reaksiyon gerçekleşemez. IR hasarında, yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir⁽⁶³⁾.

C. Lökosit inhibisyonu: Reperfüzyon sırasında lökositlerin kapiller yatakta birikmesi doku hasarını daha da artırır. Lökositlerce üretilen serbest radikaller ve ayrıca artmış adezyon ve kemoreaktan özellikleri; hasarın artışına katkıda bulunur. Adenozin lökositlerden serbest radikal yapımını inhibe ederken, TGF- β ve CD11-CD18 'e karşı monoklonal antikorlar lökositlerin endotele adezyonunu inhibe ederler. Antiproteazlar da lökosit proteaz aktivitesini inhibe ederek, lökosit infiltrasyonunu ve mikrovasküler geçirgenlik artışını engeller^(15,20).

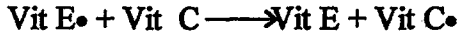
D. Antioksidanlar: Peroksidasyonu önleyen ajanlardır. Vitamin-E, β -karoten propranolol, kalsiyum kanal blokerleri kaptopril ve lipoksijenaz inhibitörü nafazatromu bu grupta sayabiliriz⁽²⁰⁾.

Endojen antioksidanlar, peroksi (ROO) ve alkoksi (RO) radikaller ile reaksiyona girerek lipid peroksidasyon reaksiyonlarının ilerlemesini önlerler. Bu savunma başlıca Vitamin

E tarafından sağlanır. Vit E lipid radikalle reaksiyona girerek onu radikal olmayan bileşik haline dönüştürürken, kendisi radikal haline gelir^(20,64)



Vit E radikali nispeten stabil, reaktivitesi az olan bir radikaldir. Vitamin C tarafından gerçekleştirilen bir tamir olayı ile vitamin E'ye redükte olur.



Siklus Vit C radikalının semiaksoibat redüktaz tarafından redüksiyonu ile tamamlanır.

β -karoten de düşük $p\text{O}_2$ de fonksiyon gören lipofilik bir antioksidandır. Böylece düşük ve yüksek oksijen parsiyel basınçlarında hücre membranı lipid peroksidasyon zincir reaksiyonlarında, β -karoten ve Vit-E tarafından korunur. Bu iki antioksidan aynı zamanda tek oksijen temizleyicisi olarak da fonksiyon yaparlar^(15,69).

Antioksidan savunmanın diğer bir kesimini de Haber -Weiss reaksyonlarını katalize eden metalleri bağlayan bileşikler oluşturur. Bunlar başlıca; seruloplazmin, transferrin, haptoglobin ve albumin olup, ekstrasellüler antioksidanlar olarak da adlandırılırlar. İnsanda plazma antioksidan aktivitesinin büyük kısmı seruloplazmine bağlıdır. Seruloplazminin demirin transferrine bağlanmasını kolaylaştırarak ve ekstrasellüler SOD gibi davranarak antioksidan etkinlik gösterir. Transferrin demiri, haptoglobin demir gibi davranabilen serbest hemoglobini, albumin bakırı bağlayarak antioksidan fonksiyon yapar^(20,25).

E. Hipotermi: Ekstremitenin, turnike uygulaması sırasında lokal soğutulması iskemik hasarı azaltır. Bu sayede periferik sinirlerde hasar oluşmadan turnikeyi 4 saate kadar güvenle kullanan otörler vardır. Ayrıca hipotermi ile, turnikeye bağlı oluşan ödemin azaldığı da belirtilmiştir^(45,65,66).



GEREÇ VE YÖNTEM

Çalışmamızda ağırlıkları 200-250 gram arasında değişen 32 adet Wistar Albino türü rat kullanıldı. Ratlar öncelikle dört gruba ayrıldılar (her grup için n=8). Birinci gruptaki ratların sağ arka uyluğuna lastik turnike uygulanarak, 120 dakikalık iskemi oluşturuldu, sonra 60 dakikalık reperfüzyona izin verildi⁽⁴⁾. İkinci gruptaki 8 rat da aynı işleme tabi tutuldu, ayrıca turnike uygulanmadan 10 dakika önce başlayan ve turnike süresince devam eden soğuk jel paketlerle (Cold Hot Pack, 3M Center, St. Paul, Minnesota) soğutma uygulandı. Soğuk jel paketler; %95'i su, kalanı toksik olmayan karboksimetilselüloz karbonhidrat içermekteydi. Tüm jeller derin dondurucuda ve -12 °C'de soğutuldu⁽⁶⁵⁾. Üçüncü ve dördüncü gruptaki 16 rata, beş gün süreyle ağızdan 10 mg/kg allopürinol (Atabay, İstanbul) tedavisi uygulandı⁽³⁾. Deneyden iki saat önce son dozları verildi. Üçüncü gruptaki 8 rat için de aynı işlem uygulandı. Dördüncü gruba, ikinci gruptaki gibi soğutmayla beraber aynı işlemler uygulandı. Ratların arka ekstremitelerinden, soleus (tümüyle) ve gastroknemius kasları çıkarıldı. Karşı ekstremiteden alınan kaslar kontrol grubu olarak kullanıldı.

Ultrastrüktürel çalışmalar Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi, Histoloji Anabilim Dalında; Zeiss EM 900 elektronmikroskopi ile, soleus yaş ağırlıkları tayini 0.0001 hassasiyette Sartorius Basic Terazisi ile ve soleus kasından total glutatyon, MDA ve total protein tayinleri ise Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyoloji Laboratuvarında; Shimadzu UV-1208 spektrofotometrisi ile yapıldı.

Cerrahi teknik: Anestezi amacıyla, 50 mg/kg dozda intraperitoneal sodyum pentobarbital kullanıldı. Tüm deneklerin sağ arka uyluğuna iki saat süreyle 5 mm enindeki lastik turnike; arteriyel kan akımını engeleyecek kadar sıkılıkta ve aynı kişi tarafından

uygulandı. İskemik süre sonunda turnike açılarak bir saatlik reperfüzyona izin verildi. Bu sürenin bitiminde ratlar, servikal dislokasyonla öldürüldü. Her iki arka ekstremité posteriorundan girilerek soleus ve gastroknemius kasları çıkarıldı. Soleus kasları, Sartorius Basic Terazi ile tartıldıktan sonra, sıvı azot tankına bırakıldı.

Ultrastrüktürel Araştırma Yöntemi:

Gastroknemius kaslarından alınan örnekler, 1 mm³ büyüklüğünde parçalara ayrılarak, 1/15 M fosfat tamponlu % 2,5' luk gluteraldehit solusyonunda, pH = 7,4 ve +4°C de tesbit edildi. Daha sonra fosfat tamponunda 4 kez yıkanan doku örnekleri, 1/15 M'lik fosfat tamponlu % 1'lik osmium tetraoksit (OsO₄) ile +4°C de ikinci kez tesbit edildiler. Daha sonra tekrar fosfat tamponuyla yıkanarak ve etil alkol serilerinden geçirilerek sudan kurtarıldılar. Doku parçaları araldit CY 212, DDSA ve BDMA içeren materyale gömülerek belli bir süre etüvde tutuldular. Elde edilen bloklardan alınan ince kesitler önce kurşun sitrat sonra, uranil asetat ile boyandı. Zeiss EM-900 mikroskobu ile incelenerek resimlendirildi.

Doku protein düzeyinin ölçümü

Doku protein düzeyi, Lowry metodu ile Shimadzu UV-1208 spektrofotometresi kullanılarak tayin edildi⁽³⁶⁾.

Reaktifler:

1. Karışım : 1 kısım %2'lik Na K tartarat solusyonu
1 kısım %1'lik CuSO₄ (5H₂O'lu) solüsyonu
32 kısım 0.1 Na OH içinde %2'lik Na₂ CO₃
2. Folin ciocolteu's fenol 1/1 oranında sulandırılır.

3. Standart: Bovine serum albumin (BSA) 1 mg/ml distile suda sulandırılır.

4. K r: Distile su

Numuneler (homojenat veya süpernatant) belirli oranda distile su ile dil e edildi (20 ml numune + 80 ml distile su). Bunun  zerine 2 ml karışım ilave edilerek karıştırıldı. 15 dakika oda ısısında bekletildi. 0.2 ml folin ciocolteu's fenol ilave edilerek vortekslendi. 1 saat oda ısısında bekletildi. 750 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Standart da numune gibi dil e edilerek çalışıldı. Numune optik dansitesinin standart optik dansiteye bölümü ile elde edilen değer; mg protein/ml olarak doku protein miktarını göstermektedir.

Doku lipid peroksidasyon düzeyinin  l m 

Lipid peroksidasyonunun son yıkım ürünü olan malonildialdehit (MDA) düzeyleri TBARS (Thiobarbituric Acid Reactive Substance) testiyle belirlendi⁽⁶⁷⁾.

Reaktifler:

1. %0,6'lık tiyobarbitt rik asit (TBA)
2. %1'lik fosforik asit
3. n-butanol
4. %1,15 'lik KCL
5. Standart, Tetraetoksipropan

%1,15'lik soğuk KCL içindeki %10'luk doku homojenatlarından 0,5 ml alınarak üzerine 3 ml %1'lik fosforik asit ve 1 ml %0,6 'lık TBA solusyonu ilave edildi. Karıştırıldıktan sonra 45 dakika kaynar su banyosunda bekletildi. Tüpün  st kısımdan

ayrılan n-butanol fazı 535 ve 520 nm dalga boylarında spektrofotometrede okundu. İki absorbands değeri arasındaki fark; nmol /gr olarak doku MDA düzeyini göstermektedir.

Doku total glutatyon düzeyinin ölçümü:

Modifiye Ellmans yöntemi (Yeğen ve ark.) ile tayin edildi⁽⁷²⁾. Doku tartıldı, bunun 9 katı ağırlığında %10'luk TCA (trikloroasetik asit) eklendi ve homojenize edildi. 3000 rpm 'de 15 dakika 20°C'de santrifüj edildi. 250 µl supernatana 1000 µl (1 ml) 0,3 M Na₂HPO₄ eklendi. Üzerine 125 µl DTNB (5,5'- dithiobis - 2- nitrobenzoic acid) kondu. Oda ısısında 5-10 dakika bekletildi. 412 nm dalga boyunda spektrofotometrede okundu. Absorbans değeri, 4,23 sabit sayısıyla çarpılarak µmol/g cinsinden, doku glutatyon değerini verir.

İstatistiksel analiz:

Dört deney gruplarından elde edilen soleus kaslarına ait yaş ağırlık, total protein, MDA ve glutatyon değerleri iki yönlü varyans analizi tekniği kullanılarak değerlendirildi. Sonuçlar tablo II ve Şekil 3,4,5,6'da gösterilmiştir.

Soleus yaş ağırlığı, total protein ve glutatyon değerleri yönünden hem kontrol - turnike, hem de gruplar arası fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$). MDA değeri bakımından ise; kontrol ve turnike grupları arasındaki farkı anlamlı bulunmasına karşın, gruplar arasındaki fark anlamlı bulunmamıştır ($p>0,05$).

Her bir grup için yapılan t-testi analizinde ise, total protein dışındaki parametreler için ilk 3 grupta kontrol - turnike grupları arasında anlamlı fark olmasına karşın ($p<0,05$), 4.grupta anlamlı fark çıkmamıştır($p>0,05$).

BULGULAR

Histolojik Bulgular: Kontrol grubuna ait enine geçmiş kesitte, myofibrillerin düzenleniş ve yapı bakımından normal olduğu izlendi. Çekirdek sarkolemmanın hemen altında ve yassı olarak dikkati çekti. A ve I bantlarının ve alt yapı olarak Z çizgileri, H bandı, M çizgileri ve ara dokuda yer alan mitokondriyonların normal yerleşimde ve yapıda oldukları gözlemlendi (Resim 1).

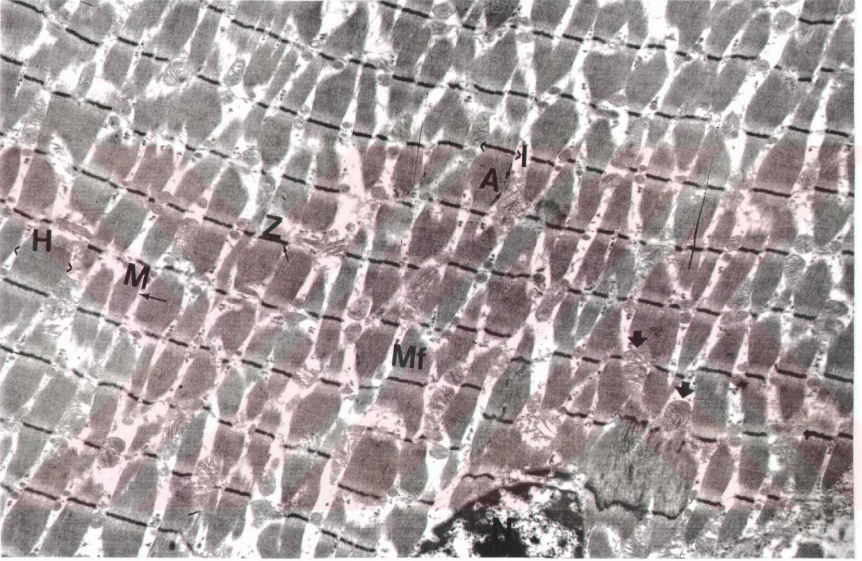
Tedavi uygulanmayan (2 saat turnike, 1 saat reperfüzyon uygulanan) gruptan alınan ince kesitlerde, myofibrillerin atrofiyi taklit edencesine yer yer eridiği, sitoplazmaya doğru tarak dişi görünümünü alarak kesintiye uğradığı dikkati çekti. Z çizgileri, H bandı ve M çizgilerinin düzensizleştiği ve yer yer kaybolduğu gözlemlendi. Mitokondriyonda belirgin dejenerasyon, kristalarında silinme saptandı (Resim 2).

Hipotermi uygulanan gruptan alınan ince kesitlerin elektronmikroskopik incelemesinde; bazı alanlarda myofibrillerin eridiği düzenliliğinin bozulduğu gözlemlendi. Z çizgilerinde ve mitokondriyonlarda yer yer dejeneratif değişiklikler saptandı. Ancak tedavi uygulanmayan turnike grubuna göre yapısal düzenliliğin daha iyi korunduğu dikkati çekti (Resim 3).

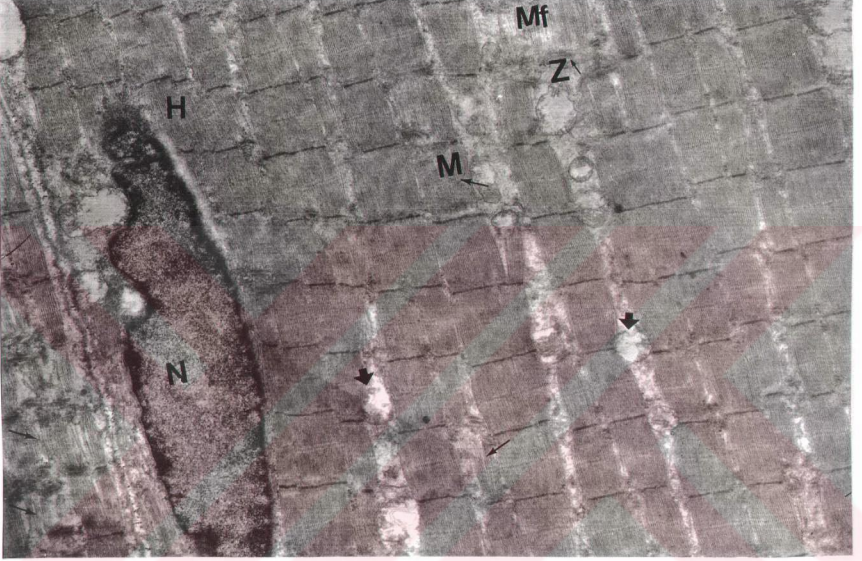
Allopürinol uygulanan grupta, myofibrillerin yapı ve düzenleniş bakımından kontrol grubuna yakın görünümde olduğu saptandı. Çekirdek sarkolemmanın hemen altında yassı olarak yerleşmişti. Z çizgileri, H bandı ve M çizgileri normaldi. Ara dokudaki mitokondriyonlar, diğer hücre organellerinin iyi korunmuş olduğu ayırt edildi (Resim 4).

Allopürinol ve hipotermimin birlikte uygulandığı grupta, myofibrillerin paralel uzanırları genel olarak korunmuştu. Z çizgileri, H bandı ve M çizgilerinin normal yapı içinde

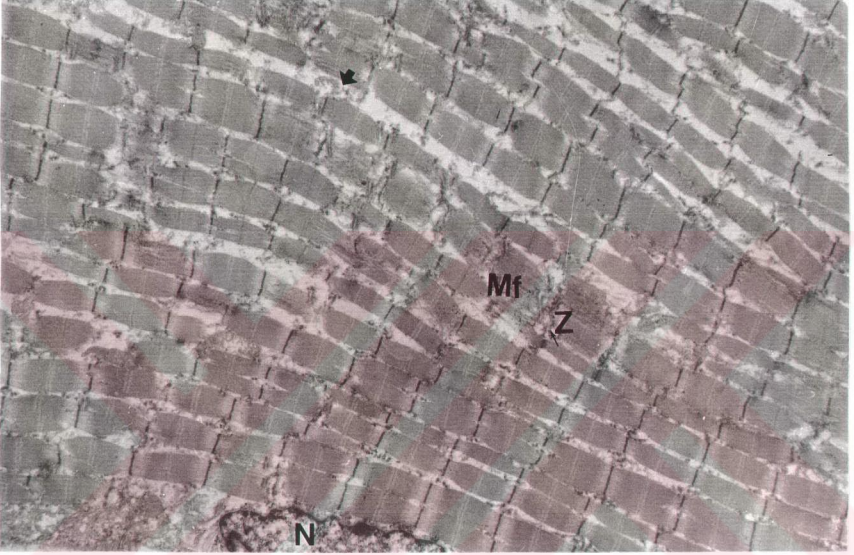
stürekliği devam ettiği görüldü. Bazı mitokondriyon matrikslerinde yoğunlaşma dikkati çekti (Resim 5).



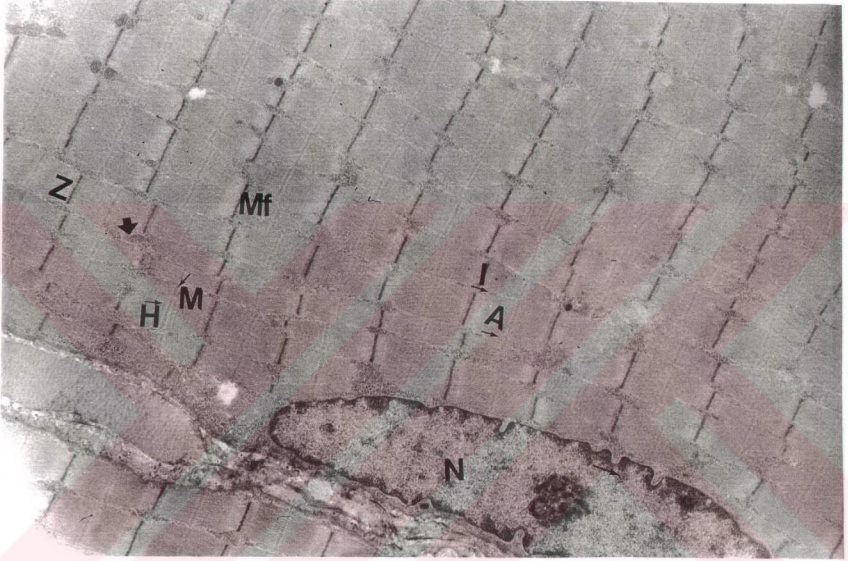
Resim 1: Kontrol grubu. Enine kesitte kas lifleri (Mf), görülmüyor. Z çizgileri (Z↑), A ve I bandları (A↓, <I>) belirgin olarak seçilmekte. H bandları (<H>) ve M çizgileri (M) düzgün olarak görüldü. Ara dokudaki mitokondriyon (♣) normal yapıda dikkati çekiyor. Kurşun sitrat X6000.



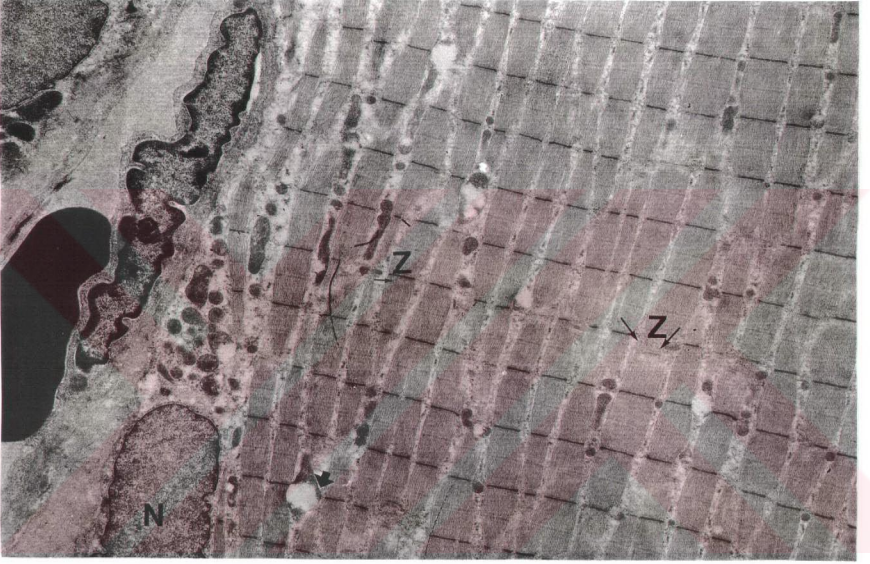
Resim 2: Tedavi uygulanmayan grup (iki saat turnike ve arkasından bir saat reperfüzyon uygulanan grup). Myofibrillerde (Mf) erime ve ayrılmalar (↓) dikkati çekiyor. Çekirdek (N) sarkolemmanın altında yassı olarak görülüyor. H-bandı (H), M (M←) ve Z- çizgilerinin (Z←) yer yer kaybolduğu, mitokondriyonlarda (↑) genel olarak belirgin dejenerasyon olduğu gözleniyor. Kurşun sitrat x14000.



Resim 3: Hipotermi grubu. Bazı alanlarda myofibrillerin (Mf) düzenliliğinin bozulduğu ve eridiği dikkati çekiyor. Çekirdek (N) sarkolemanın altında izleniyor. Z-çizgilerinde (Z↑) yer yer bozulmalar ve mitokondriyonlarda (↗) dejeneratif değişiklikler gözleniyor. Kurşun sitrat x 6000.



Resim 4: Allopürinol tedavisi uygulanan grup. Myofibriller (Mf), A ve I bandları (A→, I→) normal görünümünde. Çekirdek (N), Z-çizgileri (Z), H-bandı (H↑) ve M-çizgileri (M↓) düzenli olarak izlendi. Mitokondriyon (↑) ve hücre organellerinin iyi korunmuş olduğu gözleniyor. Kurşun sitrat x8800.



Resim 5: Hipotermi ve alloptürinol uygulanan grup. Yassı çekirdek (N), Z-çizgileri (Z) ve mitokondriyonda yer yer bozulmalar görüldü. Bununla beraber genel olarak yapının korunduğu dikkati çekti. Kurşun sitrat x14000.

Biyokimyasal bulgular: Tüm parametreler standart sapmalarıyla birlikte tablo II'de verilmiştir. Grupların hepsinde turnike uygulaması , soleus yaş ağırlığında artışa yol açmıştır. Bu artışlar I. grupta en yüksektir.

Soleus kası yaş ağırlığı: Tablo-II ve Şekil 3'de, I. grupta kontrol ve turnike grubu arasında farkın en yüksek olduğu görülmektedir. T-testi analizinde I, II ve III. gruplarda kontrol ve turnike grubu arasındaki fark anlamlı bulunmuştur ($p<0.05$), IV.grupta ise fark bulunmamıştır ($p>0.05$). Gruplar arasında soleus yaş ağırlığı bakımından anlamlı farklılık vardır ($p<0.05$). Buradan gruplar arasında önemli bir etkileşim olduğu söylenebilir.

Total Protein Değerleri; Tablo-II ve şekil-4'te görüldüğü gibi, I. grupta kapiller geçirgenliğin artışının kanıtı olarak en yüksek fark vardır. Gerek turnike-kontrol grubu, gerek gruplar arasında; istatistiksel olarak anlamlı fark saptanmıştır ($p<0.05$). IV. grupta kontrol-turnike grupları arasındaki fark çok az olmasına karşın, standart sapmanın yüksekliği nedeniyle; t-testi analizinde anlamlı fark çıkmıştır.

Total glutatyon değerleri: Artan oksidatif stresin göstergesidir. Tablo-II ve şekil-5'te I.grupta, deney-kontrol grupları arasındaki farkın en yüksek olduğu izlenmektedir. İstatistiki olarak gruplar arası anlamlı fark vardır ($p<0.025$). Diğer bir deyişle IV. gruptaki oksidatif stresin I. gruba kıyasla minimal olduğunu söylemek mümkündür. T-testi analizinde IV.grupta turnike-kontrol grupları arasında anlamlı fark bulunamamıştır.

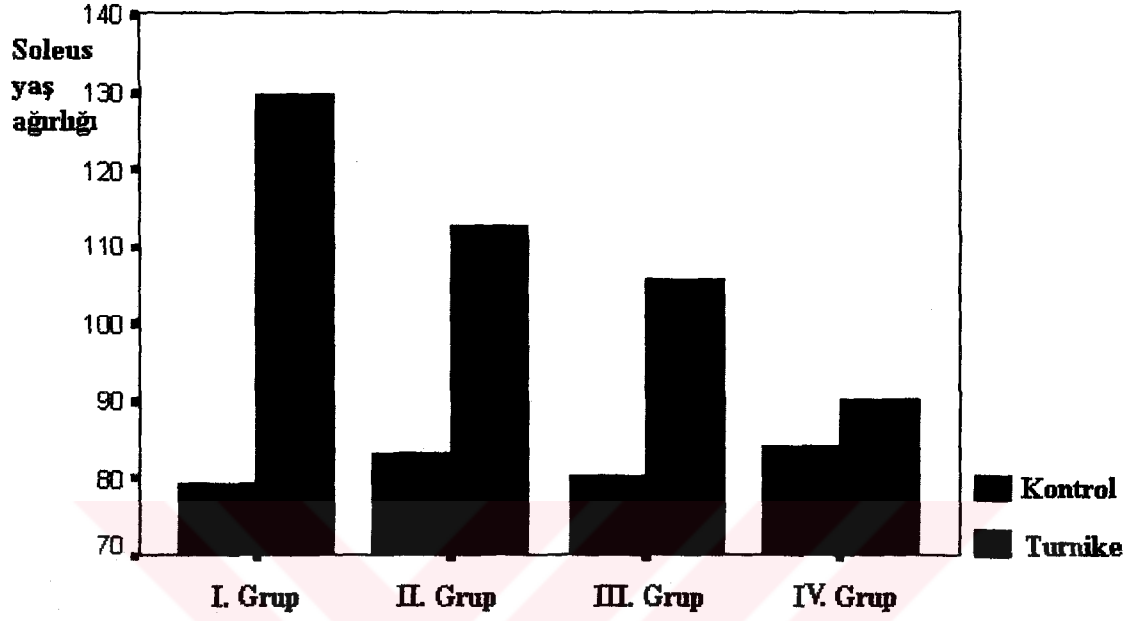
Doku MDA değerleri: Lipid peroksidasyonunun bir göstergesi olan MDA değerleri şekil-6 ve tablo-II'de gösterilmiştir. İki yönlü varyans analizinde kontrol ve turnike grupları

arasında anlamlı bir fark ($p < 0.05$) saptanmasına rağmen, gruplar arası anlamlı farklılık izlenmemiştir ($p > 0.05$). T-testinde, IV.grup dışında tüm grupların kontrol-turnike grupları arasında anlamlı fark saptanmamıştır.

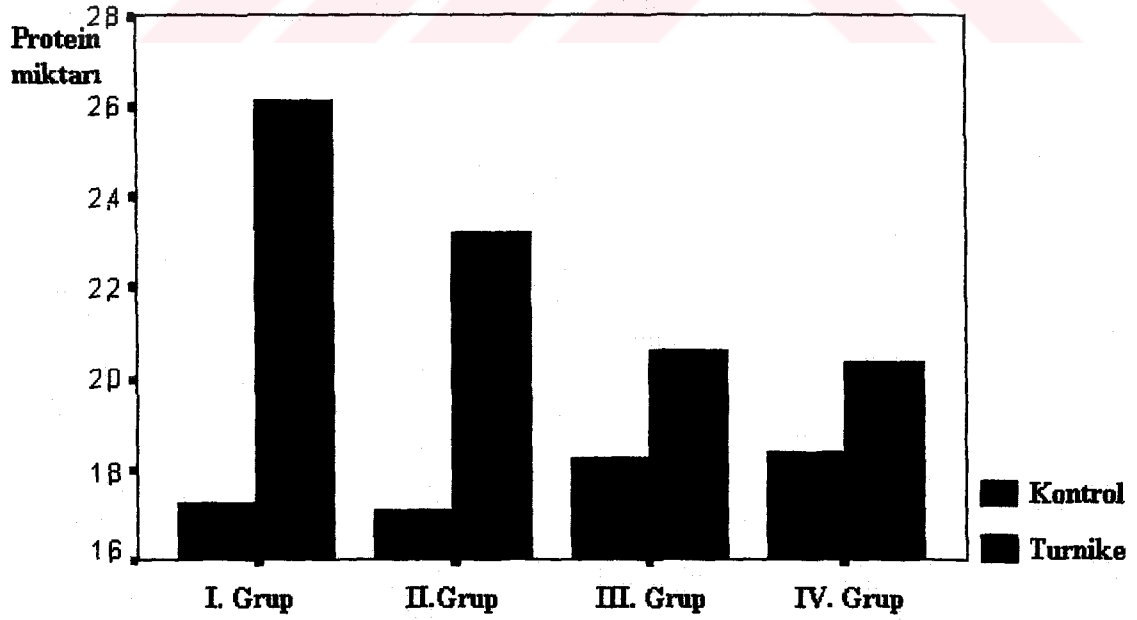


	Ik	It	IIIk	IIIt	IIIk	IIIIt	IVk	IVIt
Soleus yaş ağırlığı (mg)	79,35±6,57	129,83±11,30	83,25±11,67	112,73±14,0	80,25±9,59	105,47±7,67	84,25±9,63	90,23±12,37
Protein miktarı (mg)	1,72±0,17	2,61±0,12	1,71±0,11	2,32±0,08	1,83±0,11	2,06±0,09	1,84±0,10	2,04±0,12
Total glutatyon (µmol/gr)	2,25±0,24	1,25±0,19	2,29±0,34	1,67±0,24	2,27±0,20	1,72±0,26	2,32±0,13	2,12±0,12
MDA (nmol/gr)	27,80±3,89	53,40±9,60	31,60±6,20	45,60±6,06	32,00±6,89	45,50±8,09	32,22±4,90	37,33±2,65

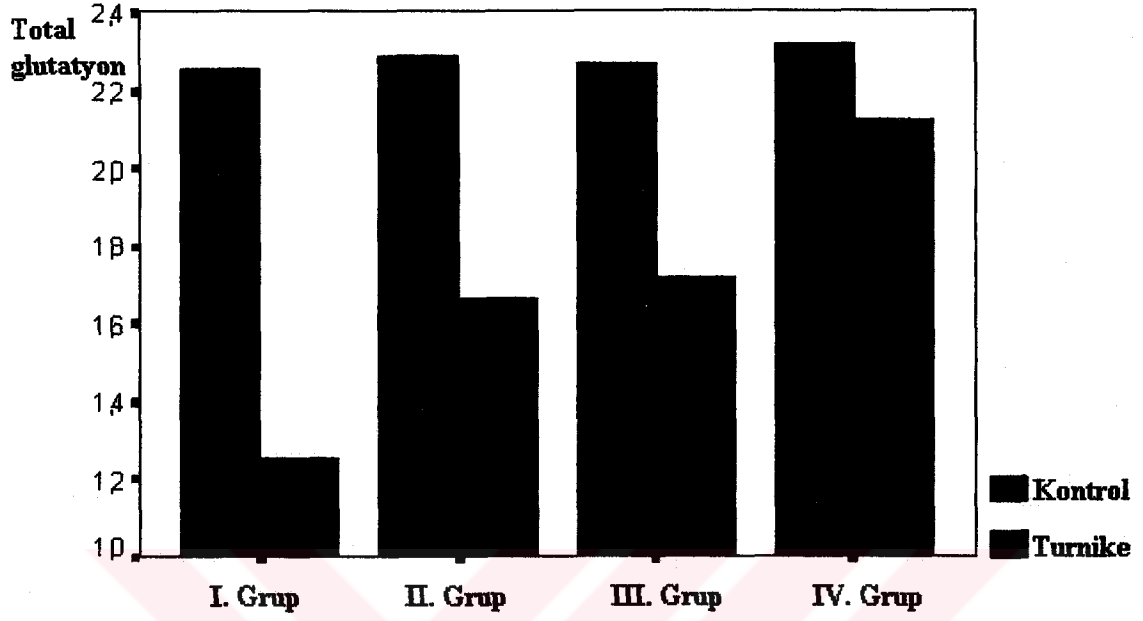
Tablo 2: Tüm parametrelerin ortalama ve standart sapmaları (k=kontrol, t=turnike)



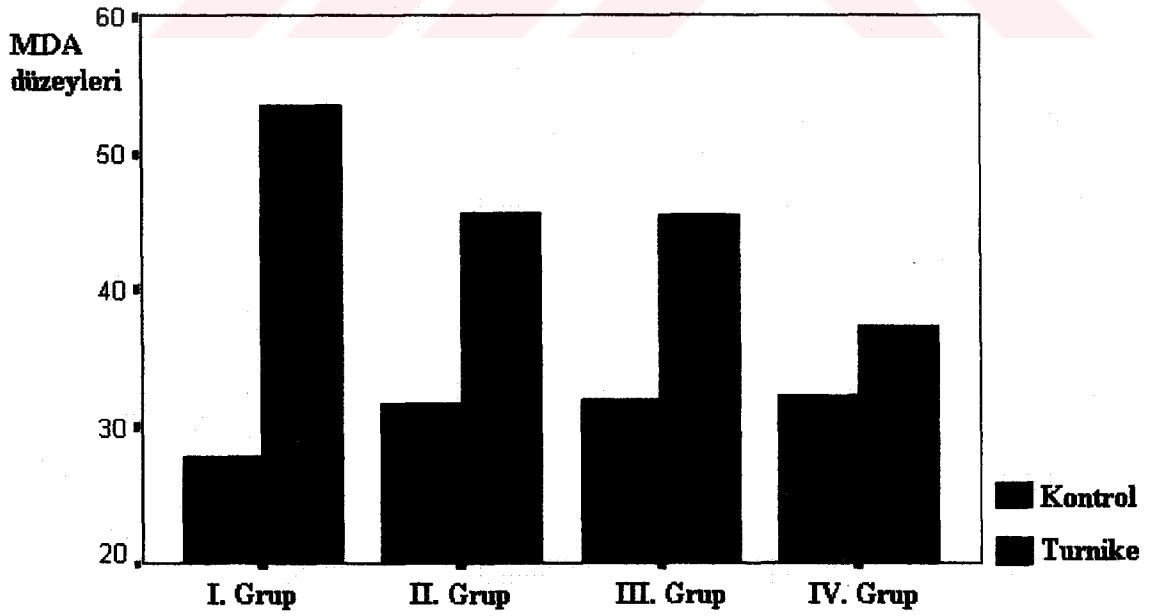
Şekil 3: Soleus yaş ağırlıkları (mg)



Şekil 4: Total protein miktarları (mg-protein/ml)



Şekil 5: Total glutatyon düzeyleri (µmol/gr)



Şekil 6: MDA düzeyleri (nmol/gr)

TARTIŞMA VE SONUÇ

Turnikeye bağlı nöromusküler hasar iki fazlıdır; iskemi ile başlar, reperfüzyon sırasında artar. İskemi sırasında hücrelerde, iyonik dengeyi ve homeostazı sürdürmek için enerji kullanılır, metabolizma anaerobik yola kayar. Enzim sistemlerinin bozulmasıyla hücre ölümü oluşabilir. Reperfüzyon hasarından sorumlu üç bileşen, serbest radikallerin üretimi, endotelyal kemoreaktan maddelerin salınımı ve lökositlerin adezyonunda artıştır. Hidroksi radikali serbest radikaller içinde en reaktif olanıdır ve lipid peroksidasyonunu başlatır^(5,8,21).

Birçok çalışmada turnike uygulamasının oksidatif strese neden olduğu ortaya konmuştur. Oksidatif stresin artmasıyla değişik derecelerde hücre ve doku hasarı oluşur. İskelet kasında, iskemi-reperfüzyon hasarıyla oluşun serbest radikallerin büyük oranda kaynağı endotelyal ksantin oksidazdır. Birçok araştırmacı; gerek iskelet kası, gerek başka dokularda ksantin oksidaz inhibitörü alloprinol uygun dozda kullanarak, serbest radikal oluşumunu azaltmışlardır^(3,5,25,32).

Herhangi bir tedavi uygulanmadan, turnike kullanılarak iskelet kasında oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında; kas yaş ağırlığı, protein miktarı, glutasyon ve MDA düzeyleri yönünden, kontrol grubuyla karşılaştırıldığında, anlamlı farklılıklar saptadık ($p<0.05$). Elektronmikroskopik incelemede; myofibriller ve mitokondriyonda dejenerasyon, Z-M çizgileri ve H-bandında düzensizlik saptandı (Resim 2). Bu bulgular literatürle uyumluydu^(3,6,17,23).

Lokal hipotermi, iki saatten fazla sürmesi beklenen girişimler için turnike süresini güvenle uzatabilen bir yöntem olarak bilinmektedir. Hipotermi uygulandığı dokunun metabolik hızını yavaşlatır. Böylelikle turnikeye bağlı artan doku ödemi ve iskeminin yolaçtığı mikrovasküler değişiklikleri azalttığı belirtilmiştir. Swanson ve ark. lokal hipoterminin iskemi sonrası ödemi ve paralizi gelişimini önlediğini saptamışlardır⁽⁶⁵⁾. Hipotermi dokularda oksijen tüketimini ve karbondioksit üretimini azaltır. Vücut ısısının her bir derece düşmesi metabolizmada %8'lik azalmaya yol açar. Diğer bir deyişle 28°C'deki dokuda metabolizma yarıya iner. Ikemoto ve ark.'nın bir çalışmasında; serum laktat, potasyum ve pH değerleri, hipotermik ekstremitelerde, normotermik olana göre daha hızlı normale döndüğü bildirilmiştir⁽²⁴⁾. Tüm bu bulgular; hipoterminin lokal kas metabolizmasını yavaşlatarak doku hasarını azalttığını ve düzelmeyi hızlandırdığını göstermektedir.

Tajima hipotermiyi klinik kullanımda: turnike şişirilmeden önce, genel anestezi indüksiyonundan sonra, 30-40 dakikalık sürede yapmaktadır⁽⁶⁶⁾. Swanson ise anestezi indüksiyonundan önce bu işlemin yapılmasını önerir⁽⁶⁵⁾. Böylelikle hastaların gereksiz yere uzun anestezi almamış olur. Ameliyat odası daha az sürede kullanılır. Tajima üst ekstremitelerde kullandığı bu yöntemle; dört saati bulan turnike süresine karşın ciddi bir komplikasyonla karşılaşmadığını bildirmiştir. Aynı zamanda hipotermi uygulanan ekstremitelerde ödemin daha az olduğunu vurgulamıştır. Raynaud hastalığı veya diğer vazospastik bozuklukları olanlarla, uyumsuz hastalarda uygulanması önerilmez^(24,65,66).

Lokal hipotermi uyguladığımız II.grupta, kapiller geçirgenliğin I.gruba göre daha az olduğunu saptadık ($p<0.05$). Dokudaki oksidatif stresin artışının göstergesi olan glutatyon azalması da, I.gruba göre düşük bulunmuştur ($p<0.05$). Lipid peroksidasyonunun son ürünü

olan MDA düzeyi, tüm gruplarda artmış olmakla beraber, I.grupta en fazla bulunmuştur. İki yönlü varyans analizinde doku MDA düzeyleri bakımından gruplar arası fark anlamlı çıkmadı. Bunda sanıyoruz, standart sapmaların yüksekliği ve grupların az denekten oluşması (n=8) etkendi. Hipotermi uygulanan grubun elektronmikroskopik incelemesinde, I grup kadar olmasa da myofibriler bütünlüğün ve Z-çizgilerinin düzeninin bozulduğu ve mitokondriyonlarda dejenerasyon olduğu gözlemlendi. Biz Swanson'un önerdiği -12°C'lik soğutmayı uyguladık, belki Ikemoto ve ark.'nın önerdiği, daha fizyolojik gibi görünen (-4°C) uygulamayla bu histopatolojik değişiklikler oluşmayabilecekti^(24,65,66).

Menger ve ark., SOD ve allopürinol tedavisi ile IR'a bağlı akım paradoksunun başarıyla önlendiğini, buna karşılık "no reflow" fenomenine etkilerinin ise kısmi olduğunu belirtmişlerdir^(40,41). Wright ve ark. ise "no reflow" fenomeninin önlenmesinde, heparinin etkili olduğunu saptamışlardır⁽⁷¹⁾.

Allopürinol tedavisi uyguladığımız III.grupta; doku MDA ve total glutatyon düzeyleri I. gruptan farklıydı. Geçirgenliğin bu grupta daha iyi korunduğunu söyleyebiliriz. Allopürinol tedavisi alan grubun kontrolleri ile, I.grubun kontrolleri; MDA düzeyleri yönünden karşılaştırıldığında, aralarında anlamlı fark olmadığı görüldü (p>0.05). Buradan fizyolojik şartlarda allopürinolün fonksiyonel önemi olmadığı sonucuna varabiliriz. Bu grubun elektronmikroskopik incelemesinde; myofibriller, mitokondriyon ve diğer ara organellerin iyi korunduğunu söyleyebiliriz.

Allopürinol ve lokal hipotermimin kombine kullanıldığı IV.grupta; kontrol- turnike grupları arasında; soleus yaş ağırlığı, doku glutatyon ve MDA düzeyleri yönünden anlamlı fark bulunamadı (p>0.05). Diğer bir deyişle iskemi-reperfüzyon hasarı ikili tedavi ile, en aza

indirildi. Elektronmikroskopik incelemede, bazı mitokondriyon matrikslerinde yoğunlaşma izlenmesine rağmen, myofibrillerin ve H-bandı, M ve Z çizgilerinin genel olarak iyi korunduğu gözlemlendi.

Turnike kullanımının neden olduğu oksidatif stresin önlenmesinde birçok tedavi metodu başarıyla kullanılabilir. İskelet kası iskemisinde oluşan serbest radikallerin büyük kısmının oluşumundan endotelial ksantin oksidaz enzimi sorumludur. Bu amaçla bir ksantin oksidaz inhibitörü olan allopürinol tedavisiyle lokal hipotermiyi kombine ederek kas ağırlığı, total protein, glutatyon ve MDA değerlerinde, tedavi uygulanmayan gruba göre anlamlı değişiklikler saptadık. Histolojik kesitlerde de fibriller yapının korunmuş olduğu saptandı^(32,35,40,41,71).

Turnike kullanımı nedeniyle oluşan oksidatif stresi önlemede; fizyolojik (superoksit dismutaz, katalaz), farmakolojik (allopürinol, heparin, antioksidanlar) ve fiziksel (hipotermi, hipoksik reperfüzyon) tedavi yaklaşımları kullanılabilir^(20,32,35,71). Bu tedavi yöntemlerinden hiçbiri tek başına doku hasarını önlemede yeterli bulunmamıştır. Bu noktadan hareketle, yaptığımız tedavi kombinasyonu (ksantin oksidaz inhibitörü ve hipotermi) olumlu sonuç verdi. Sanıyoruz yakın gelecekte, iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde kombine tedavi seçenekleri tıp biliminin gündemini oluşturacaktır.

ÖZET

Bu çalışmada, turnike kullanımının neden olduğu oksidatif stresin önlenmesi için değişik tedavi yöntemleri karşılaştırıldı. Dört farklı gruptaki toplam 32 ratın arka sağ ekstremiteleri iki saat iskemi ve sonrasında bir saat reperfüzyona maruz bırakıldı. I. gruba herhangi bir tedavi verilmedi. II. grup iskemi öncesi ve sırasında soğutuldu, III. gruptaki ratlara beş günlük allopürinol tedavisi uygulandı. IV. gruptaki ratlara ise beş günlük allopürinol ve lokal hipotermi uygulandı. Soleus kası yaş ağırlığı, total protein, malonildialdehit ve glutatyon düzeylerine bakıldı. Gastroknemius kaslarından alınan örnekler elektronmikroskopik incelemeye tabi tutuldu. Karşı ekstremitelerden alınan kaslar kontrol gruplarını oluşturdu. İstatiksel inceleme için, gruplar arasında iki yönlü varyans analizi, gruplar içinde ise t-testi kullanıldı. Turnike kullanımının tedavi uygulanmayan grupta; oksidatif stresi ve kapiller geçiriliği arttırdığı; buna karşılık allopürinol ve hipotermi kombinasyonunun bu zararlı etkileri tersine çevirdiği gösterildi.

KAYNAKLAR

1. Abdel-Salam A, Eyres KS: Effects of tourniquet during total knee arthroplasty. *J Bone Joint Surg (Br)* 77:250-253,1995
2. Aho K, Sainio K, Kianta M, Varpanen E: Pneumatic tourniquet paralysis. *J Bone Joint Surg (Br)* 65: 441-443, 1983
3. Appell HJ, Duarte JA, Glöser S, Remiao F, Carvalho F, Bastos ML: Administration of tourniquet. *Arch Orthop Trauma Surg* 116: 101-105, 1997
4. Barie PS, Mullins RJ: Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia. *J Surg Res* 44:284-307, 1988
5. Benzon HT, Toleikis R, Meagher L, Shapiro BA, Ts'ao CH, Avram MJ: Changes in venous blood lactate, venous blood gases and somatosensory evoked potentials after tourniquet applicaton. *Anesthesiology* 69:677-682, 1988
6. Blebea J, Kerr JC, Shumko JZ, Feinberg RN, Hobson RW: Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *J Surg Res* 43:311-321, 1987
7. Bruner JM: Safety factor in the use of the pneumatic tourniquet for hemostasis in surgery of the hand. *J Bone Joint Surg (Am)* 33:221-224, 1951
8. Chabel C, Russel LC, Lee R: Tourniquet-induced limb ischemia: A neurophysiologic animal model. *Anesthesiology* 72:1038-1044, 1990

9. Chervu A, Moore WS, Homsher E, Quinones- Baldrich WJ: Diferential recovery of skletal muscle and peripheral nerve function after ischemia and reperfusion. *J Surg Res* 47:12-19, 1989
10. Chiu D, Wang H, Blumenthal MR: Creatine phosphokinase release as a measure of tourniquet effect on skeletal muscle. *Arch Surg* 111:71-74, 1976
11. Cohen JD, Keslin JS: Massive pulmonary embolism and tourniquet deflation. *Anesth Analg* 79:583-585, 1994
12. Crandall RE, Weeks PM: Multiple nerve dysfunction after carpal tunnel release. *J Hand Surg (Am)* 13: 584-589, 1988
13. Crenshaw AH: Surgical techniques: Campbell's Operative Orthopaedics. Sekizinci baskı. Crenshaw AH (ed) Mosby Year Book, St. Louis 1992, S:3-22.
14. Crenshaw AG, Hargens AR, Gershuni DH, Rydevik BL: Wide tourniquet cuffs more effective at lower inflation pressures. *Acta Orthop Scand* 59:447-451, 1988
15. Del Maestro RF, Thaw H, Björk J, Planker M, Arfors KE: Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 492:43-57, 1980
16. Dreyfuss UY, Smith RJ: Sensory changes with prolonged double-cuff tourniquet time in hand surgery. *J Hand Surg (Am)* 13:736-740, 1988
17. Farber JL, Chein KR, Mittnacht S: The pathogenesis of irreversible cell injury in ischemia. *Am J Pathol* 102: 271-281, 1981

18. Fish JS, Mckee NH, Pynn BR, Kuzon WM, Plyley MJ: Isometric contractile function recovery following tourniquet ischemia. *J Surg Res* 47: 365-370, 1989
19. Freeman BA, Crapo JD: Biology of disease. Free radicals and tissue injury. *Lab Invest* 47:412-426, 1982
20. Grace PA: Ischemia-reperfusion injury. *Br J Surg* 81: 637-647, 1994
21. Hargens AR, Schmidt DA, Evans KL, Gonsalves MR, Cologne JB, Garfin SR, Mubarak SJ, Hagan PL. Akesson WH: Quantitation of skeletal-muscle necrosis in a model compartment syndrome. *J Bone Joint Surg (Am)* 63:631-636, 1981
22. 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: H213-220, 1986
23. Heppenstall RB, Scott R, Sapega A, Park YS, Change B: A comparative study of the tolerance of skeletal muscle to ischemia. *J Bone Joint Surg (Am)* 68:820-828, 1986
24. Ikemoto Y, Kobayashi H, Usui M, Ishii S: Changes in serum myoglobin levels caused by tourniquet ischemia under normothermic and hypothermic conditions. *Clin Orthop* 234:296-302, 1988
25. Jarasch ED, Bruder G, Heid HW: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 548:39-46, 1986
26. Jennische E: Ischaemia-induced injury in glycogen-depleted skeletal muscle. Selective vulnerability of FG-fibers. *Acta Physiol Scand* 125:727-734, 1985

27. Jorensen HRI: Myoglobin release after tourniquet ischemia. *Acta Orthop Scand* 58:554-556, 1987
28. Klenerman L: The tourniquet in surgery. *J Bone Joint Surg (Br)* 44:937-943, 1962
29. Klenerman L, Biswas M, Hulands GH, Rhodes AM: Systemic and local effects of the application of a tourniquet. *J Bone Joint Surg (Br)* 62:385-388, 1980
30. Klenerman L, Crawley J, Lowe A: Hyperaemia and swelling of a limb upon release of a tourniquet. *Acta Orthop Scand* 53:209-213, 1982
31. Klenerman L, Hulands GH: Tourniquet pressure for the lower limb. *J Bone Joint Surg (Br)* 61:124, 1979
32. Klenerman L, Lowe N, Miller I, Fryer R, Green J, Jackson MJ: Dantrolene sodium protects against experimental ischemia and reperfusion damage to skeletal muscle. *Acta Orthop Scand* 66(4): 352-358, 1995
33. Krackow KA: A maneuver for improved positioning of a tourniquet in the obese patient. *Clin Orthop* 176: 168-180, 1982
34. Larsson J, Bergström J: Electrolyte changes in muscle tissue and plasma in tourniquet - ischemia. *Acta Chir Scand* 144:67-73, 1978
35. Lee KR, Cronenwet JL, Schlafer M, Corpron C, Zelenock GB: Effect of superoxide dismutase plus catalase on Ca^{++} transport in ischemic and reperfused skeletal muscle. *J Surg Res* 42:24-32, 1987

36. Lowry OH: Protein measurement with folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265-267,1951
37. Lundborg G: Structure and function of the intraneural microvessels as related to tourniquet trauma, edema formation and nerve function. *J Bone Joint Surg (Am)* 57: 938-948, 1975
38. Lundborg G, Rydevik B: The tourniquet in extremity surgery; how can complications be avoided? *Acta Orthop Scand* 58:497-498, 1987
39. McLaren AC, Rorabeck CH: The pressure distribution under tourniquets. *J Bone Joint Surg (Am)* 67:433-438, 1985
40. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messer K: Microvascular ischemia - reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox" . *Am J Physiol* 263: H1-901-H1906, 1992
41. Menger MD, Steiner D, Messmer K: Microvascular ischemia - reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". *Am J Physiol* 263:H1892-H1900, 1992
42. Miller SH, Price G, Buck D, Neeley J, Kennedy TJ, Graham WP, Davis TS: Effects of tourniquet ischemia and postischemic edema on muscle metabolism. *J Hand Surg* 4:547-555, 1979
43. Moore MR, Garfin SR, Hargens AR: Wide tourniquets eliminate blood flow at low inflation pressures. *J Hand Surg (Am)* 12:1006-1011, 1987

44. Muirhead A, Newman R J: A low-pressure tourniquet for lower limb surgery. *Injury* 17:53-54, 1986
45. Nakahara M: Tourniquet effects on muscle oxygen tension in dog limbs. *Acta Orthop Scand* 55:576-578, 1984
46. Newman RJ: Metabolic effects of tourniquet ishaemia studied by nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Bone Joint Surg (Br)* 66:434-440, 1984
47. Nitz AJ, Dobner J: Upper extremity tourniquet effects in carpal tunnel release. *J Hand Surg (Am)* 14:499-504, 1989
48. Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: Biochemistry distribution and physiology. *Acta Physiol Scand (Suppl)* 548:87-99, 1986
49. Patterson S, Klenerman L: The effect of pneumatic tourniquets on the ultrastructure of skeletal muscle physiology. *Acta Orthop Scand* 52:171-175, 1981
50. Pedowitz RA: Tourniquet-induced neuromuscular injury. *Acta Orthop Scand (Suppl)* 245: 1-33,1991
51. Pedowitz RA, Gershuni DH, Schmit AH, Friden J, Rydevik BL: Muscle injury induced beneath and distal a pneumatic tourniquet: A quantitative study of tourniquet pressure and duration. *J Hand Surg (Am)* 16:610-621, 1991
52. Pedowitz RA, Gershuni DH, Botte MJ, Kuiper S, Rydevik BL. Hargens AR: Effects of reperfusion intervals on skeletal muscle injury beneath and distal to a pneumatic tourniquet. *J Hand Surg (Am)*17:245-255 1992

53. Reid HS, Camp RA, Jacob WH: Tourniquet hemostasis. A clinical study. *Clin Orthop* 177:203-234, 1983
54. Rudge P: Tourniquet paralysis with prolonged conduction block. electro-physiologic study. *J Bone Joint Surg (Br)* 56:716-720, 1974
55. Rush JH, Vidovich JD, Johnson MA: Arterial complications of total knee replacement. *J Bone Joint Surg (Br)* 69:400-402, 1987
56. Santavirta S, Höckerstedt K, Linden H: Pneumatic tourniquet and limb blood flow. *Acta Orthop Scand* 49:565-570, 1978
57. Sapega AA, Heppsentall B, Chance B, Park YS, Sokolow D: Optimizing tourniquet application and release times in extremity surgery. *J Bone Joint Surg (Am)* 67:303-314, 1985
58. Saunders KC, Louis DL, Weingarden SI, Waylonis GW: Effect of tourniquet time on post-operative quadriceps function. *Clin Orthop* 143:194-199, 1979
59. Shaw JA, Murray DG: The relationship between tourniquet pressure and underlying soft-tissue pressure in the thigh. *J Bone Joint Surg (Am)* 1148-1152, 1982
60. Shenton DW, Spitzer SA, Mulrennan BM: Tourniquet induced rhabdomyolysis. A case report. *J Bone Joint Surg (Am)* 72:1405-1406, 1990
61. Sherman OH, Fox JM, Snyder SJ, Del Pizzo W, Friedman MJ, Ferkel RD, Lawley MJ: Arthroscopy - "No-problem surgery". *J Bone Joint Surg* 68:256-265, 1986

62. Silver R, Garza J, Rang M, Koreska J. Limb swelling after release of a tourniquet. *Clin Orthop* 206:86-89, 1986
63. Smith JK, Carden DL, Grisham MB, Granger DN, Korthius RJ: Role of iron in postischemic microvascular injury. *Am J Physiol* 256:H1472-H1477, 1989
64. Suval WD, Duran WN, Borlic MP, Habson RW, Brendsen PB, Ritter AB: Microvaskular transport and endothelial cell alterations preceeding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. *Am J Surg* 154: 211-218, 1987
65. Swanson AB, Livegood LC, Sattel AB: Local hipothermia to prolong safe tourniquet time. *Clin Orthop* 264:200-208, 1991
66. Tajima T: Considerations on the use of the tourniquet in surgery of the hand. *J Hand Surg (Am)* 8:799-802, 1982
67. Uchiama M, Mihara M: Determination of malonyldialdehyde precursor in tissues by thiobarbuturic acid test. *Ann Biochem* 86:271-278,1978
68. Van Roeckel HE, Thurston AJ: Tourniquet pressure: the effect of limb circumference and systolic blood pressure. *J Hand Surg (Br)* 10: 142-144, 1985
69. Weiss ST: Oxygen, ischemia and inflamation. *Acta Physiol Scand (suppl)* 548:3-37,1986
70. Wilgis EFS: Observations on the effects of tourniquet ischemia. *J Bone Joint Surg (Am)* 53:1343-1346, 1971

71. Wright JG, Kerr JC, Valeri R, Hobson RW: Heparin decreases ischemia- reperfusion injury in isolated canine gracilis model. Arch Surg 123:470-472, 1988
72. Yeğen B, Dedeoğlu I, Aykaç S, Oktay S, Yalçın AS: Effects of cold restraint stress on glutathione and lipid peroxide levels in the liver and glandular stomach of rats. Pharm Res 221:45-48, 1990

