

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EKSTREMİTE İSKEMİSİ ESNASINDA EKSTREMİTENİN
%25'LİK MANNİTOL, EURO COLLİNS VE HUMAN
ALBUMİN SOLÜSYONLARI İLE PERFÜZYONUNUN
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Özgen KIVANÇ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi
Anabilim Dalı
TIPTA UZMANLIK TEZİ

ESKİŞEHİR
2011

T.C.
ESKİŞEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

EKSTREMİTE İSKEMİSİ ESNASINDA EKSTREMİTENİN
%25'LİK MANNİTOL, EURO COLLİNS VE HUMAN
ALBUMİN SOLÜSYONLARI İLE PERFÜZYONUNUN
İSKEMİ/REPERFÜZYON HASARINA ETKİNLİĞİNİN
ARAŞTIRILMASI

Dr. Özgen KIVANÇ

Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi

Anabilim Dalı

TIPTA UZMANLIK TEZİ

TEZ DANIŞMANI

Prof. Dr. Cengiz ÇETİN

ESKİŞEHİR

2011

TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI

T.C.
ESKİSEHİR OSMANGAZİ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA,

Dr Özgen KIVANÇ'a ait '**Ekstremitte iskemisi esnasında ekstremitenin, %25' lik mannitol, Euro Collins ve Human Albumin solüsyonları ile perfuzyonunun iskemi-reperfuzyon hasarına etkinliğinin araştırılması**' adlı deneysel çalışma jürimiz tarafından Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda Tıpta Uzmanlık Tezi olarak oy birliği ile kabul edilmiştir.

Tarih: 11.11.2011

Jüri Başkanı: Prof. Dr. Cengiz ÇETİN
Plastik Rek. Ve Estetik Cer. A.D.

Üye: Prof. Dr. A. Aydan KÖSE
Plastik Rek. Ve Estetik Cer. A.D

Üye: Doç.Dr.Yakup KARABAĞLI
Plastik Rek. Ve Estetik Cer. A.D

Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Fakülte Kurulu'nun/...../2011
Tarih ve ../.. Sayılı Kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Necmi ATA
Dekan

TEŞEKKÜR

Eskisehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı'nda yapmış olduğum uzmanlık eğitimim boyunca, bilgi ve deneyimlerini aktararak yol gösteren sayın hocalarım Prof. Dr.Cengiz ÇETİN, Prof.Dr. A.Aydan KÖSE, Doç.Dr. Yakup KARABAĞLI ve Yrd. Doç. Dr. Emre KOÇMAN'a; tezimi yapmamda emeği geçen Dr. Ahmet KÖRMUTLU ve Dr. Sezi MANGIR, Histoloji ve Embriyoloji AD'den Yrd. Doç. Dr. Dilek BURUKOĞLU ve Biyoistatistik AD. çalışanlarına sonsuz sevgi, saygı ve şükranlarımı sunarım.

ÖZET

Kıvanç, Ö. Ekstremitte iskemisi esnasında ekstremitenin, %25' lik Mannitol, Human Albumin ve Euro Collins solüsyonları ile perfüzyonunun iskemii/reperfüzyon hasarına etkinliğinin araştırılması. Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Estetik ve Rekonstruktif Cerrahi Anabilim Dalı Tıpta Uzmanlık Tezi, Eskişehir, 2011. 56 adet Sprague Dawley cinsi dişi rat randomize olarak eşit sayıda (n=7), 1. Grup ve 2. Grup olmak üzere iki ana grup ve dört alt gruba ayrıldı. Tüm gruplarda; sağ inguinal bölge diseksiyonunun ardından sağ femoral arter klemplenecek, sağ alt ekstremitte 4 saat iskemiiye bırakıldı. İskemi süresinin ardından, femoral arter 39 gauge'lik insülin enjektörüyle kanülize edildi. Alt gruplardan Kontrol gruplarına herhangi bir solüsyon kullanılmadı. Reperfüzyon öncesi M₁ gruplarına 3 mg/kg dozda %25'lik mannitol solüsyonu ile; HA₁ gruplarına 0.5 cc Human Albumin solüsyonu ile; EC₁ gruplarına 0.5 cc Euro Collins Solüsyonu ile intravasküler olarak, iskemik sağ alt ekstremitte perfüzyonu uygulandı. 1. gruplarda , 4 saatlik reperfüzyon yapıldı. 2. gruplarda; iskemik ekstremitte için, 1. gruplarda kullanılan perfüzyon solüsyonları, reperfüzyon öncesi aynı dozda ve aynı yolla kullanılarak, yumuşak dokular ve cilt sütüre edildi ve sağ alt ekstremitte bir hafta reperfüzyona bırakıldı. Tüm gruplarda reperfüzyon süresinin ardından, histolojik incelemeler için soleus kası ve akciğer örnekleri alındı. Histolojik incelemede, dokular hematoxilen-eosin boyasıyla boyanıp ışık mikroskopunda değerlendirildi. Belirlenen parametreler için histolojik skorlamalar yapıldı. Sonuçlar, istatistiksel olarak değerlendirildiğinde; 1. gruplarda bulunan ile 2. gruplarda bulunan kontrol grupları ile perfüzyon solüsyonlarının uygulandığı gruplar arasında ileri derecede farklılık mevcuttu. Bu çalışmanın sonucu; iskemik olan dokunun intravasküler yolla reperfüzyon öncesi, antioksidan özelliği olan solüsyonlarla perfüzyonunun yapılması iskemii/reperfüzyon hasarını azaltmaktadır.

Anahtar kelimeler: İskemi /reperfüzyon, mannitol, Human Albumin, Euro Collins,

ABSTRACT

Kıvanç, Ö. Investigating of ischemia/reperfusion injury, reperfusion with %25 Mannitol, Human Albumin and Euro Collins solutions during extremity ischemia. Eskisehir Osmangazi University Plastic, Aesthetic and Reconstructive Surgery Department. Expertise Thesis. Eskisehir,2011. 56

Sprague Dawley female rats were randomly divided into eight equal groups (n=7). All groups were classified by their reperfusion times. Four groups were named as '1. groups' and four groups were named as '2. groups'. After dissection of right inguinal region at all subjects of the experiment; femoral artery was clamped and ischemia was performed at 4 hours. After ischemic period, right femoral artery was canuled with 39 gauge insulin syringe. In control groups, only ischemia and reperfusion was done. In M₁ and M₂ groups, at the dose of 3 mg/kg %25 mannitol solution, in HA₁ and HA₂ groups at the volume of 0.5 cc Human Albumin solution and in EC₁ and EC₂ groups at the volume of 0.5 cc Euro Collins Solution was used as reperfusion solutions to perfuse ischemic right lower extremity before reperfusion period began. At 1. groups, 4 hour reperfusion was done. At 2. groups, after perfusing ischemic extremity with the perfusion solutions used as the same as 1. group; soft tissues and skin was sutured and one week reperfusion was done. After reperfusion period ended in all groups, soleus muscle biopsies from right extremity and lung biopsies were taken for histological reserch. Samples were stained with hematoxilen-eosin and examined by light microscopy and scored according to the parameters described before. Results were analysed statistically and comparing control groups with the groups at which perfusion solutions was used; the results were statistically meaningful. As a result, regardig to our study; before reperfusion, perfusing ischemic tissue by its own artery with the solutions which have antioxidant properties, reduces ischemia/reperfusion injury.

Key Words: ischemia/reperfusion, mannitol, Human Albumin, Euro Collins.

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
TEZ KABUL VE ONAY SAYFASI	iii
TEŞEKKÜR	iv
ÖZET	v
ABSTRACT	vi
İÇİNDEKİLER	vii
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	viii
ŞEKİLLER DİZİNİ	x
TABLolar DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
2.GENEL BİLGİLER	5
2.1. İskemi	5
2.2. Reperfüzyon	10
2.3. İskemi/Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları	12
2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri	12
2.4. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Lökosit ve Endotel Etkileşimi	17
2.5. Mikrodolaşım ve <i>No-Reflow Fenomeni</i>	19
2.6. Kompleman Sisteminin Rolü	20
2.7. Sitokinler	20
2.8. Nitrik Oksit	21
2.9. Ekstremitte İskemi/Reperfüzyon Fizyopatolojisi ve Uzak Organ Hasarı	22
2.10. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Akciğerlere Olan Etkisi	23
2.11. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Tedavi Seçenekleri ve Antioksidanlar	25
2.12 Mannitol	30
2.13. Human Albumin	32
2.14. Euro Collins Solüsyonu	35
3.GEREÇ VE YÖNTEM	36
3.1. Deneklerin Hazırlanması ve Operasyon Tekniği	37
3.2. Deney Grupları	38
3.3 Histolojik Teknikler	38

	Sayfa
3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri	39
4.BULGULAR	40
4.1. Akciğer Işık Mikroskopik Değerlendirmeleri	40
4.2. Soleus Kası Işık Mikroskopik Değerlendirmeleri	46
4.3. İstatistiksel Analiz	51
5. TARTIŞMA	57
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	71
KAYNAKLAR	72

SİMGELER VE KISALTMALAR

ADP	Adenozin difosfat
ARDS	Akut respiratuar distres sendromu
ALT	Alanin aminotransferaz
AMP	Adenozin monofosfat
ATP	Adenozin trifosfat
Ca	Kalsiyum
CAT	Katalaz enzimi
CD18	Hücre yüzey bağlanma proteinini 18
CD11b	Hücre yüzey bağlanma proteinini 11b
C5a	Kompleman 5a
C ₁	Kompleman 1
C _{3a}	Kompleman 3a
C _{3b}	Kompleman 3b
CK	Kreatin kinaz
CPK	Kreatin fosfo kinaz
Cys	Sistin aminoasidi
Cu	Bakır
ÇOYS	Çoklu organ yetersizliği sendromu
DNA	Deoksiribo nükleik asit
ELAM-1	Endotel lökosit aeyon molekülü
Fe	Demir
GSHPx	Glutasyon peroksidaz
GST	Glutasyon S-Transferaz
GSSG	Okside glutasyon
H	Hidrojen
HOCL	Hipoklorik asit
H ₂ O ₂ ⁻	Hidrojen peroksit
HO ₂ ⁻	Perhidroksi radikali
H ₂ O	Su

ICAM-1	Hücreiçi adezyon molekülü
IL ₁	İnterlökin-1
IL ₆	İnterlökin-6
İL ₈	İnterlökin 8
İL _{1β}	İnterlökin-1β
I/R	İskemi/reperfüzyon
K	Potasyum
LDH	Laktat dehidrogenaz
LO [•]	Alkoksil radikal
LOO [•]	Peroksil radikal
LOOH	Lipid hidroperoksit
LTB ₄	Lökotrien B ₄
Lys	Lizin
MAC	Makrofaj saldırı kopmpleksi
MDA	Malonildialdehit
Met	Metiyonin
MPO	Myeloperoksidaz
Na	Sodyum
NAD ⁺	Nikotinamid adenin dinükleotid
NADH	Nikotinamid adenin dinükleotid hidrojen
NADPH	Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat hidrojen
NO	Nitrik oksit
NO ₂ ⁻	Nitrit
NO ₃ ⁻	Nitrat
NOS	Nitrik oksit sentetaz
eNOS	Endotelial nitrik oksit sentaz
iNOS	İndüklenebilen nitrik oksit sentaz
nNOS	Nöronal nitrik oksit sentaz
O ₂	Moleküler oksijen
O ₂ ⁻	Süperoksit anyonu
OH	Hidroksil radikal
PAF	Trombosit aktive edici faktör

RS ⁻	Tiyil radikali
RCOO	Organik peroksitler
SGOT	Aspartat amino transferaz
SOD	Süperoksit dismutaz
SİYS	Sistemik inflamatuvar yanıt sendromu
SOR	Serbest oksijen radikalleri
TNF α	Doku nekroz faktörü alfa
TXA ₂	Tromboksan A ₂
Vit C	C vitamini
VCAM-1	Vasküler hücre adezyon molekülü
Zn	Çinko

ŞEKİLLER

	Sayfa
2.1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik Ca artısının kaynakları ve sonuçları	7
2.2. Haber- Weiss Reaksiyonu ile moleküler oksijenin tek değerlikli İndirgenmesi sonucu SOR oluşumu	17
2.3. İskemi reperfüzyon hasarında lökosit-endotel etkileşimi	19
2.4. İskemi/reperfüzyon hasarında salgılanan mediyatörler	21
2.5. Akut akciğer hasarında hasarlı alveol ile normal alveolün karşılaştırması	24
2.6. Albuminin üçboyutlu yapısı ve bağlanma bölgeleri	33
2.7. Albuminin yapısında bulunan 34. Sistein aminoasidinin nitrojenlenmesi ve albuminin oksitlenmesi ve tiyollenmesi	34
2.8. İnsan albuminin antioksidan ve pro-oksidan özellikleri	35
4.1. Normal akciğer dokusu	40
4.2. K ₁ grubu akciğer örnekleme	40
4.3. M ₁ grubu akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi	41
4.4. HA ₁ grubu akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi	41
4.5. EC ₁ grubu akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi	42
4.6. K ₂ grubu akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi	43
4.7. M ₂ grubu akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi	43
4.8. HA ₂ grubu akciğer doku örnekleme	44
4.9. EC ₂ grubu akciğer doku örnekleme	44
4.10. Normal soleus kası ışık mikroskopik görünümü	46
4.11. K ₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri	46
4.12. M ₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri	47
4.13. EC ₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri	47
4.14. HA ₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri	48
4.15. K ₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri	48
4.16. M ₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri	49
4.17. EC ₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri	49

	Sayfa
4.18. HA ₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri	49
5.1. Birinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	52
5.2. İkinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	53
5.3. Birinci grup içi kas dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	55
5.4. Birinci grup içi kas dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	55

TABLOLAR

	Sayfa
2.1. Dokuların kritik iskemi zamanları	5
2.2. İskemi veya hipoksinin hücresele etkileri	8
2.3. Serbest oksijen radikallerinin zararları	13
2.4. Serbest radikal kaynakları	14
2.5. Radikal olan ve radikal olmayan reaktif bileşikler	15
2.6. Enzim olan endojen antioksidanlar	26
2.7. Enzim olmayan endojen antioksidanlar	25
2.8. Vitamin olan endojen antioksidanlar	26
2.9. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar	26
2.10. Euro-Collins Solüsyonunun elektrolit değerleri	35
4.1. Akciğer dokularındaki hasar skorlaması	44
4.2. Soleus kas dokusundaki hasar skorlaması	49
5.1. Birinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	51
5.2. İkinci grupların akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	52
5.3. Birinci grupların kas dokularının istatistiksel karşılaştırılması	53
5.4. İkinci grupların kas dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları	54

1. GİRİŞ

Günümüzdeki modern cerrahi yöntemlerin ve teknolojinin sunduğu gelişmiş imkanlara rağmen; serbest doku nakilleri ve reimplantasyonu içeren mikrocerrahi prosedürler, turnike kullanımı, akut arter tıkanıklığı ve arter yaralanması gibi durumlarda, ilgili ekstremitenin ve/veya organın belirli bir süre ılık iskemide bırakılıp ardından kanlanması sağlanması; iskele/reperfüzyon hasarına yol açarak post operatif morbidite ve mortaliteyi artıran önemli bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır(1). İskemi; akut (ekstremitte amputasyonları, akut arteriyel oklüzyonlar) veya kronik (periferik arter hastalığı) olabilir. İskele kası akut iskemisi, klinikte sık karşılaşılan bir sorundur. Akut arter tıkanıklıklarının nedenleri sıklık sırasına göre; akut arter embolileri, akut arter trombozları, arter yaralanmaları ve dissekan aort anevrizmalarıdır. Kollaterallerin gelişmiş olduğu kronik iskemik durumlarda bile akut ekstremitte iskemisi, ciddi mortalite ve morbiditeye yol açabilen klinik bir sorun olarak karşımıza çıkmaktadır(2).

Plastik cerrahinin uğraşı alanlarının arasında olan reimplantasyonlar ve serbest doku aktarımlarında, doku iskemisi ve asıl olarak dolaşımın tekrar sağlanması ile oluşan reperfüzyon hasarı; cerrahi başarıyı azaltan, morbidite ve mortalite oranlarında ciddi yükselmeye neden olan bir problem olarak karşımızda durmaktadır. Cerrahi operasyonların bir kısmında; turnike kullanımı ile kansız saha elde edilerek, cerrahinin daha görülebilir bir ortamda ve daha efektif yapılması amaçlanırken; doku iskemisi kaçınılmaz bir sonuçtur. Cerrahi işlem teknik olarak başarılı olsa bile, iskele sonrasında oluşan reperfüzyon hasarı; lokal doku yıkımına, uzak organ hasarına, morbidite artışı ile mortaliteye komplikasyonlara yol açmaktadır.

İskemi; bir dokuda kan akımının durmasıdır. Dolayısıyla, dokunun oksijen ihtiyacının karşılanamadığı ve dokunun, anaerobik yollara kayarak enerji üretimine başladığı hasar mekanizmalarının ilk basamağıdır. Birinci iskele zamanı; dokunun ilk iskemik kaldığı süredir. İkinci iskele zamanı ise, reperfüzyon sonrası dokunun tekrar iskemide kaldığı süredir. İkinci iskemide, dokunun iskemiyeye direnci düşmektedir. Kritik iskele zamanı, dokunun hasarsız tolere edebildiği en uzun iskele zamanıdır. Arteriyel ve random beslenen deri fleplerinde kritik birinci iskele zamanı 13 saat iken kritik ikinci iskele zamanı 4.7 saate düşmektedir. İskele kası, metabolizmasının deriye göre daha hızlı olması nedeniyle iskemiden daha fazla

etkilenmektedir. İskelet kası 3-4 saatlik iskemi peryodundan yaşayarak çıkabilmektedir. 4 saatlik iskemi sonrası iskelet kasında irreversible değişiklikler başlamakta ve 6 saatlik iskemi sonunda bu irreversible değişiklikler neredeyse tamamlanmaktadır. Kas dokusunun dahil edildiği myokutan fleplerde kritik iskemi zamanı 4 saate düşmektedir. Bunun anlamı şudur; iskemi zamanı uzadığında; cerrahın elinde yaşayan bir deri ve ölü bir kas kalabilir(3-5).

Serbest doku aktarımlarını da kapsayan mikrocerrahi prosedürler, cerrahi operasyon esnasında dolaşımın durdurularak iskeminin olduğu bir süreyi içermektedir. Birçok serbest doku aktarımı vakasında, normotermik iskemi tolere edilir ve cerrahi başarı yaklaşık olarak % 90'nın üzerindedir. Genellikle bu tür cerrahi girişimlerde, normal koşullar altında iskemi süresi vakanın kompleksliğine göre 1.5-3 saat arasında değişmekle birlikte, daha kompleks durumlarda veya komplikasyonların olduğu durumlarda bu iskemi süresi uzamakta veya ikincil bir iskemi süresi oluşmaktadır. İskelet kasında reperfüzyonun erken dönemlerinde kan akımı artmakta iken, geç dönemlerinde azalmaktadır. İskemi kısa zamanlı olduğunda, dokuya gelen yeni kan akımı (reperfüzyon) kısa bir süre içinde dokunun doğal yaşam koşullarını oluştururken; uzamış iskemi durumlarında bu yeni kan akımı doku için ölümcül olabilmektedir(5).

Serbest doku aktarımlarında, iskemiye neden olan üç durum mevcuttur. Bunlardan ilki çok geniş kaldırılmış fleplerde oluşan distal bölge iskemisidir. Distal bölge iskemisi; parsiyel flep nekrozuyla sonuçlanır. Diğer iki neden ise arteryel oklüzyona ve venöz oklüzyona bağlı global iskemilerdir. Her ikisinde de, total flep kaybı gerçekleşse de; eşit iskemi zamanlarında venöz global iskemi, arteryel global iskemiyeye göre daha hasar vericidir(5).

İskelet kası iskemisi; herhangi bir nedenle oluşan akut arter tıkanması sonucunda sık olarak karşımıza çıkan klinik bir problemdir. Akut iskemi gelişen bir ekstremiteye kan akımı yeniden sağlandığı zaman (reperfüzyon), iskemik periyotta oluşandan daha fazla iskelet kası nekrozu meydana gelebilir. Bu durum, etkilenen extremitede ödem, metabolik asidoz ve makroskopik myoglobüri ile kendini gösterir. İskemi/reperfüzyon hasarının sistemik etkisi ile bazı vakalarda akut renal yetmezlik, akut solunum yetmezliği, kalpte fonksiyon bozukluğu ve ölüm meydana gelebilir. Klinikte bu durum "myonefropatik metabolik sendrom" olarak bilinir.

Adından anlaşılacağı üzere bu sendromun tanısal bulguları myoglobinüri, hiperpotasemi ve asidozdur; sırasıyla 3 dönemi mevcuttur(2).

- 1- İskemik faz: Ağrı, bacakta rijidite, masif ödem ve iskemik doku bulgularını içerir.
- 2- Revaskülarizasyon fazı: Masif ödem, ciltte ısınma, yer yer nekrotik sahalar, aşırı fasyal kompresyon (fasyotomi endikedir), myoglobinüri (48 saatte pik yapar).
- 3- Reperfüzyon fazı: Kan pH'sı düşer, K⁺ yükselir, CPK artar, LDH artar, SGOT artar(2).

Tedavide; sıvı elektrolit dengesi, kalp ve böbrek fonksiyonlarının restorasyonu ve izlemi önem taşımaktadır. Bikarbonat uygulaması, hiperkaleminin kontrolü, hemodiyaliz işlemleri üç ana tedavi prensibini oluştururken; mannitol infüzyonları, sıvı resusitasyonu ile zorlu diürez medikal tedavinin ek bileşenleridir. Endikasyon dahilinde fasyotomi yapılması, erken amputasyon gündemde tutulmalıdır(2). Bu olaylar sonucu % 15-22' yi bulan oranlarda mortalite ve %30'u bulabilen majör amputasyon söz konusu olabilir(7).

Bir iskemi periyodu sonrasında, kesilmiş olan kan akımının tekrar sağlanması reperfüzyon olarak adlandırılmaktadır. Reperfüzyon, iskemik dokunun yaşamı için gereklidir. Bununla birlikte, iskemi esnasında anaerobik metabolizma sonucu biriken metabolitler ile reperfüzyon esnasında oluşan reaktif oksijen radikalleri ve diğer mediatörler; ilk etapta, endotel hücre şişmesine ve vasküler permeabilite artışına neden olurlar. Ardından iskemi/reperfüzyon hasar mekanizmaları başlayarak, iskemik kalan dokunun harabiyeti ve uzak organ hasarı oluşur. Oluşan bu hasar; dokunun tipi, iskemi süresi ve reperfüzyon süresine bağlı olmakla birlikte, uygulanacak olan tedavi edici ajanlar ile azaltılabilmektedir(6,8).

İskemi reperfüzyon hasarının temelinde, reperfüzyon esnasında dokunun oksijenizasyonu sonucu ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri bulunmaktadır. Reaktif oksiradikaller birçok kaynaktan salınabilirler, bunlar arasında en önemli olanı, reperfüzyon esnasında dokuya gelen aktive olmuş nötrofillerdir. Aktive olmuş nötrofiller, antimikrobiyal savunma sisteminde kullandıkları mekanizma olan NADPH oksidaz enzimi aktivasyonu ile reperfüzyonla gelen moleküler oksijenden, seri reaksiyonlar sonucunda toksik radikaller oluşturarak ileri doku hasarına neden

olurlar(8,9). Reperfüzyon döneminin en önemli mikrovasküler patolojisi olan kan akımının geri dönmemesi fenomenine (*no reflow fenomeni*), aktive olmuş nötrofiller ile trombositlerin kapillerlerdeki agregasyonları sonucu oluşan, kapiller tıkaçların neden olduğu bildirilmiştir(8,9).

Akut iskemi gelişen bir ekstremiteye kan akımı yeniden sağlandığı zaman, iskemik periyotta oluşandan daha fazla iskelet kası nekrozu meydana gelebilir. Bu durum etkilenen ekstremitelerde ödem, metabolik asidoz, mikroskobik myoglobinüri ile kendini gösterir(7,8). Cerrahi işlemler sırasında dokuların iskemisi ve sıklıkla bunu takip eden bir reperfüzyon periyodu vardır. Özellikle akciğer ve böbrek, hassas yapıları nedeniyle iskemi/reperfüzyon sonrası oluşan metabolitlerden fazlasıyla etkilenmekte ve değişik derecelerde kalıcı hasarlar oluşabilmektedir(8).

Günümüzde iskemi reperfüzyon hasarını önlemeye ve azaltmaya yönelik pek çok tedavi stratejileri geliştirilmiş ve geliştirilmeye devam etmektedir. Plastik ve rekonstrüktif Cerrahi açısından damar yaralanmaları, travmatik amputasyonlar, serbest doku aktarımları, turnike altında yapılan cerrahi girişimler, ekstremitelerin iskemi/reperfüzyon hasarına uğramasına neden olarak cerrahi başarıyı azaltan; morbidite, mortalite, hastanede kalış süresi ve tedavi maliyetini artıran önemli bir problem olarak hala güncelliğini korumaktadır(10). Yaklaşık 50 yıldır iskemi/reperfüzyon hasarının lokal ve sistemik zararlarının bilinmesine rağmen; iskemi/reperfüzyon hasarının önlenmesinde en uygun tedavi planının ne olduğu ve bu hasarın nasıl önleneceği halen tartışma konusudur(8).

Bu çalışmanın amacı, deneysel olarak oluşturulmuş rat alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon modelinde; reperfüzyon öncesi, ılık iskemi dönemindeki ekstremitenin mannitol, human albumin ve Euro Collins solüsyonları ile reperfüzyonunun, iskemi/reperfüzyon hasarındaki etkinliğinin gösterilmesidir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. İskemi

İskemi kan dolaşımı tarafından dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan ihtiyacının sağlanamaması ve oluşan atık ürünlerin uzaklaştırılmamasıdır. İskemiye bağlı doku hasarında hücrel enerji depolarının boşalması ve toksik metabolitlerin birikmesi hücre ölümüne neden olur(8,11). Oksijen homeostazı insan fizyolojisinde hayati önem taşır. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen; aynı zamanda hücrel lipid, nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynar. Dolayısıyla, protein sentezi ve aktivitesini kontrol eden kısa ve uzun dönem mekanizmalarla, hücrel ve sistemik oksijen konsantrasyonlarının dengelenmesi oksijen biyoyararlanımı açısından önemlidir(11-13). İskemide hücre zedelenmesinin patogeneğinde oksijen yetersizliğinin önemi belirtilmekle birlikte reaktif oksijen türevleri de hücre ölümünün önemli araçlarından(11,13). Bazı hücrelerin anoksiye diğerlerinden daha hassas olmalarından dolayı ekstremitelerin iskemiye toleransını değerlendirmek zor olabilir. Hücrelerin O₂ ihtiyaçları ve dokuların solunum hızları farklıdır. Derinin solunum hızıyla, retinanın solunum hızı arasında 4 kat fark vardır. Çalışmalar periferik sinir ve kasların, cilde nazaran iskemiye karşı daha duyarlı olduklarını göstermiştir. İskelet kaslarında ve periferik sinirlerde iskemiden 4-6 saat sonra geri dönüşsüz değişiklikler olmaktadır. Cilt ve cilt altı dokulardaki hücrelerin hipoksiye dayanıklı olması nedeniyle iskelet kası ve periferik sinirlere göre daha uzun süreli canlılığını sürdürebilirler(8,14). Tablo 2.1’de farklı dokuların iskemiye dayanma süreleri belirtilmiştir(8).

Tablo 2.1. Dokuların kritik iskemi zamanları

Doku	Süre
Kas	4 saat
Sinir	8 saat
Yağ	13 saat
Deri	24 saat

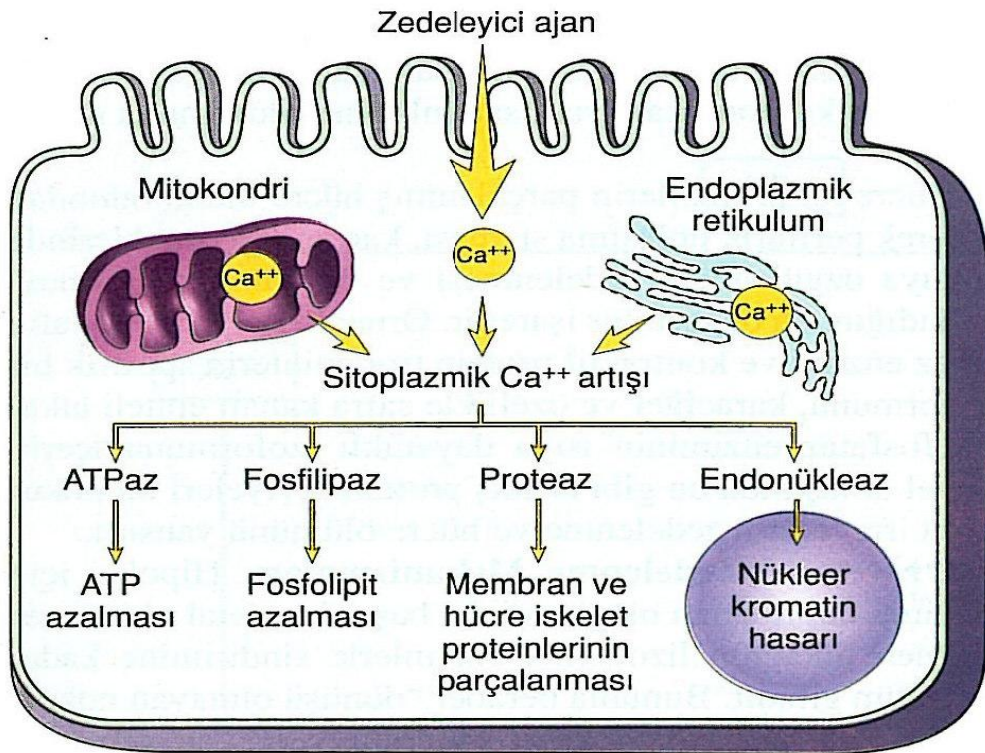
İskemi esnasında hücre depolarında bulunan ATP'ı kullanarak belirli bir süre hayatını devam ettirebilir fakat kritik iskemi zamanını aştıktan sonra hücre anaerobik solunum yaparak enerji gereksinimini sağlar(11,13,14). Sonuçta aşağıdaki olayların meydana gelmesi kaçınılmazdır.

1- Asidoz: Doku hipoksi veya anoksisi, Crebs döngüsüyle aerobik oksidasyonda azalmaya ve hücrede bulunan ATP miktarında düşüşe neden olur. Bu durum adenozin difosfat (ADP) ile fosfat birikimine ve Embden-Meyerhoff yolundaki anaerobik glikolizde artmaya neden olur. Sonuçta laktik asit ve pürivik asit oluşur. Laktat artışı ve H^+ birikimi, doku pH'sında düşmeye neden olur. Laktik asit ve düşük pH; protein denatürasyonu, enzim fonksiyonlarında kayıp, NADH rejenerasyonunun engellenmesi ve serbest radikal oluşumu gibi iskemik hasar oluşturan etkenlerin gelişimini artırır(13,15-17). Basidel(8)'in belirttiğine göre, Hayes ve arkadaşları yaptıkları bir çalışmada iskemik domuz gracilis kasında ATP azalmasının myonekroz ile ters orantılı olduğunu göstermişlerdir.

2- Makromolekül sentezinin durması: ATP seviyesindeki azalma ile birlikte; fosfolipid, protein, polisakkarid ve nükleik asitlerin, spontan veya enzim kaynaklı parçalanmalarının ardından bu yapıtaşlarının yeniden sentezlenememesi nedeniyle hücre bütünlüğü bozulmaya başlar. Aynı zamanda hücre içi Ca^{++} artışının neden olduğu fosforilaz, lipaz, proteaz ve endonükleaz enzim aktivasyonları da bu parçalanmaya katkıda bulunur(13,16).

3- İyon dengesinin bozulması: İskeminin ciddiyetine ve süresine göre hücre membranının fizyolojik bütünlüğü bozulmaya başlar. İskeminin ilk etkilediği yer mitokondridir. ATP miktarındaki net azalma Na^+/K^+ ATP'az enzimini inhibe eder. Buna bağlı olarak hücre içi Na^+ ve su artışı ile hücrede şişme meydana gelir. Hücre dışı K^+ artar. Na^+ artışı ile Na^+/Ca^{++} ve Na^+/H^+ değişim sistemleri aktive olur. Sonuçta hücre içine Ca^{++} ve H^+ akışı başlar. Hücre içi Na^+ artışı membranda depolarizasyon yaparak, geçici olarak voltaj bağımlı Ca^{++} kanallarının açılmasına ve hücre içi Ca^{++} miktarının artmasına neden olur. Hücre içinde Ca^{++} artması sonucunda fosfolipaz aktivitesini artırarak fosfolipidlerin parçalanmasına yol açar. Fosfolipidlerin yıkımı ile araşidonik asit ortaya çıkarak serbest radikal oluşturan siklooksijenaz ve lipooksijenaz yolları aktive eder. Sitoplazmada artan serbest Ca^{++} , Ca^{++} 'a bağımlı ATP'az enzimini aktive eder ve hücre içi ATP daha hızlı tüketilir.

Yüksek Ca^{++} seviyeleri mitokondri iç zarına etki ederek oksidatif fosforilasyonu ve ATP yapımını azaltır. Ayrıca yüksek Ca^{++} seviyeleri, serbest radikal oluşumunu artırır(13,14,16,18). Yüksek Ca^{++} seviyelerinin, proteaz aktivasyonu sonucu ksantin oksidaz enziminin iskemik dokuda ortaya çıkmasında, nötral proteazlar ve lizozomal proteazların aktivasyonu ile hücre iskeleti protein yapılarının yıkılması sonucu geri dönüşümsüz hasarda rol oynadıkları ortaya konmuştur(13). Şekil 2.1.'de hücre zedelenmesi sırasında sitoplazmik Ca artışı ve Ca kaynakları gösterilmiştir(13).



Şekil 2.1. Hücre zedelenmesinde sitoplazmik Ca artısının kaynakları ve sonuçları.

Sonuç olarak, uzun süreli iskemilerde; hücresel şişme, asidoz, hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış, ATP/fosfokreatin seviyesi azalması, hipoksantin seviyesinin artması, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid hidrolizi gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir(11,13,15,16). Tablo 2.2'de iskeminin hücresel etkileri gösterilmiştir(16).

Tablo 2.2. İskemi veya hipoksinin hücrenel etkileri

İSKEMİ VEYA HİPOKSİNİN HÜCRESEL ETKİLERİ
Hücrenel asidoz
Hücre membran potansiyelinde bozulma
Hücrenel iyon dağılımında bozulma (intraseküller Ca^{++}/Na^{+} oranında artış)
Hücrenel şişme
Hücre iskelet bozuklukları
Hipoksantin artışı
ATP azalması
Fosfokeratin azalması
Glutasyon azalması
Lökosit adezyon moleküllerinde artış

İskeminin süresine ve şiddetine bağlı olarak iki türlü hücrenel zedelenme ortaya çıkar:

1. Geri dönüşlü zedelenme,
2. Geri dönüşsüz zedelenme.

1- Geri Dönüşlü Zedelenme

Hipokside ilk etkilenen mitokondrial oksidatif fosforilasyonla sağlanan hücrenin aerobik solunumudur. ATP yapımı yavaşlar ya da durur. ATP kaybı hücrede yaygın olarak birçok sistemi etkiler. Özellikle, potasyumun difüzyonla dışarı atılması ve sodyumun hücre içi birikimine yol açan sodyum pompası yetersizliğine sebep olacak şekilde *oubain* duyarlı ATPaz aktivitesinin azalmasına neden olur. İyon tutulumuna izo-ozmotik su birikimi eşlik ederek akut hücrenel şişme ortaya çıkar(13).

Hücrede ATP azalınca, AMP birikir. AMP, fosfofruktokinazı uyarır; bu da anaerobik glikoliz ile glikojenden ATP sentezini arttırarak hücreye enerji sağlar. Glikoliz, laktik asit ve fosfat türevlerinin hidrolizi ile inorganik fosfatların birikimine yol açar ki; bu da hücre içi pH'yı düşürür(13). Yine iskemi sırasında devam eden başka bir olay, ATP seviyesinin azalmasına karşın ADP düzeyinin artmasıdır. Artan ADP'ler önce AMP'ye, daha sonra adenozin, inozin ve en sonunda hipoksantine dönüşür. Hipoksantin, reaktif oksijen radikallerinin prekürsörü olarak hücre

içindeki miktarı artar(13). Normal koşullarda hipoksantin, ksantin dehidrogenaz yardımıyla ksantine dönüştürülür. İskemi sırasında ksantin dehidrogenaz, ksantin oksidaza dönüşür. Substrat olarak nikotinamid adenin dinükleotid kullanan ksantin dehidrogenazın aksine ksantin oksidaz, oksijeni kullanır. Bundan dolayı hipoksantin ksantine dönüşümünü katalize edemez, sonuçta dokuda hipoksantin düzeyi aşırı seviyelere çıkar. Reperfüzyonla oksijen tekrar dokuya sunulduğunda fazla miktardaki hipoksantin, ksantin oksidaz ile reaksiyona girmesi sonucunda toksik serbest oksijen radikalleri oluşur(8,13).

Bunu izleyen olgu, granüllü endoplazmik retikulumdan ribozomların ayrılması ve polizomların bozulmasıyla monozomların oluşmasıdır. Eğer hipoksi sürerse, membran geçirgenliği azalır. Sonuçta hücre yüzeyinde şişkinlikler olur. Konsantrik laminalardan oluşan plazma ve organel membranlarından kaynaklanmış sitoplazma içinde ya da hücre dışında görülen miyelin şekiller ortaya çıkar. Bu evrede mitokondriyalar normal ya da hafifçe şişmiş ya da yoğunlaşmıştır. Endoplazmik retikulum genişlemiştir ve tüm hücre belirgin olarak şişkindir(13). Oksijen verildiğinde yani iskemi sonlandırıldığında, yukarıdaki tüm biyokimyasal ve patolojik bulgular geri dönebilir. Eğer iskemi devam edecek olursa ATP'deki azalma şiddetlenir ve geri dönüşsüz zedelenme oluşur(13).

2 - Geri Dönüşsüz Zedelenme

Morfolojik olarak kristalarından içermek üzere mitokondrilerin ileri derecede vakuolizasyonu, plazma zarlarının aşırı yıkımı, lizozomların şişmesi ve özellikle bu iskemik alanın yeniden perfüze olmasıyla hücre içine yoğun kalsiyum akışının olması şeklinde görülür. Mitokondrilerin matriksinde şekilsiz yoğunlaşmalar gelişir. Mitokondride iskemiden sonra bu erken geri dönüşsüz zedelenme bulguları 30-40 dakikada gözlenebilir(13).

Hücrenin metabolik aktivitesi ve adaptasyon mekanizmalarına göre kritik iskemi süresi farklılık göstermekle birlikte uzun süreli iskemide geri dönüşsüz hasar ve nekroz kaçınılmazdır(5,16).

Sürekli olarak aşırı geçirgen membranlardan protein, temel koenzimler ve ribonükleik asitler kaybolur. Hücre aynı zamanda yaşamını sürdürmek için gerekli olan ATP'nin yeniden oluşumunda kullanacağı hücre içi yüksek enerjili fosfatlarını yitirir(13).

PH düşmesi lizozom membranlarında zedelenmeye yol açar. Enzimler sitoplazmaya geçerek asit hidrolazların aktivasyonu ile hücre bileşenlerinin enzimatik sindirimine, bu da ribonükleoprotein, deoksiribonükleoprotein ve glikojen kaybına sebep olur(13).

Sonuç olarak ölü hücre myelin şekiller biçiminde büyük fosfolipid kitlelerine dönüşebilir. Bu ya diğer hücrelerce fagosite edilir ya da yağ asitlerine parçalanır. Yağ asitlerinin artıklarının kalsifikasyonu kalsiyum sabunlarının oluşmasına neden olur(13).

Hücrede meydana gelen iki olay geridönüşsüzlüğü karakterize eder. Bunlar önce mitokondrilerin işlev bozukluğunun yeniden kanlanma ve oksijenlenmeye karşın düzelmeyişi (oksidatif fosforilasyon ve ATP rejenerasyon yokluğu) ve daha sonra membran işlevlerinde belirgin bozuklukların gelişimidir(13).

Geri dönüşsüz hücre zedelenmesinde membran zedelenmesi sonucunda kalsiyum yüksek yoğunlukta bulunduğu hücre dışından hücre içine geçer. Reperfüzyon sağlansa dahi kalsiyum birikimi devam eder. Kalsiyum mitokondriler tarafından alınır; hücrel enzimleri inhibe eder, proteinleri denatüre eder ve koagülasyon nekrozu için karakteristik değişikliklere neden olur. Kalsiyum iyonları, hücreyi ölüme götüren biyokimyasal değişikliklerde önemli bir mediatördür (13). Hücrel fonksiyonlar hücre ölümünden önce kaybolur. Hasarın morfolojik görünümü, kritik biyokimyasal sistemlerde bozukluklar oluşup geri dönüşsüz hasar oturduktan çok sonra belirgin hale gelir. Hücre şişmesi dakikalar içinde görülebilen geri dönüşümlü bir hasardır. Geri dönüşsüz hasar 20-60 dakika içinde ışık mikroskopunda görülebilirken, hücre ölümü ancak 10-12 saatte belirgin hale gelir (13).

2.2. Reperfüzyon

Reperfüzyonun ana amacı, o doku veya organın korunması ve yeniden fonksiyonlarını kazanması için tamir edilmesidir. Bununla birlikte iskelet kası reperfüzyonu; lökosit infiltrasyonu, ödem, mikrodolaşım bozukluğu ve kas nekrozuyla karakterizedir(20). Reperfüzyonla birlikte oluşan hasarın büyüklüğü, iskemi süresi ve şiddeti ile ilişkilidir. Kısa süreli iskemilerde reperfüzyon hasarının

şiddeti hafif olurken; iskeminin süresinin uzun ve geri dönüşümsüz hasarın olduğu durumlarda reperfüzyonla birlikte hücrelerin kurtarılması mümkün olmayabilir.

İskemiye maruz kalmış bir dokunun reperfüze edilmesiyle iskemik hasarın azalacağı beklenir; ancak belli durumlarda bu mümkün olmaz ve aksine hasarın arttığı tespit edilir. Yapılan çalışmalarda; iskemik bir kas anoksik kan ile reperfüze edildiğinde, doku hasarında bir miktar daha artış gözlenmiş; yine aynı koşullarda iskemik bırakılmış kas, normoksik veya oksijenlenmiş kan ile reperfüzyon yapıldığında, mikrovasküler bariyerde bozulma, mikrovasküler permeabilite artışı ve kas hasarında ciddi artış gözlenmiştir(20). İskemi sırasında bazı hücrelerin hasara karşı duyarlı hale gelebileceği ve reperfüzyon sırasında ortaya çıkan bazı zararlı etkenler karşısında bütünlüklerini kaybedebilecekleri ileri sürülmüştür. Duyarlı hale gelmiş bu hücreleri öldürebilen en olası zararlı etkenin serbest oksijen radikalleri olduğu ileri sürülmüştür. Bunlar endotel ve parankimal hücrelerden ve inflamasyon nedeniyle dokuya nüfuz etmiş nötrofillerden kaynaklanabilir. Serbest oksijen radikalleri, lipid peroksidasyonu ile membranlara zarar verebildikleri gibi protein, DNA ve mitokondrilere de zarar verebilirler. Bunun dışında reperfüzyon esnasında hücre içine kalsiyum birikiminin yoğun bir hal aldığı ve ardından kalsiyumun özellikle mitokondrilere alınmasının reperfüzyon hasarının belkemiğini oluşturduğu yönünde kanıtlar mevcuttur. İskemi sırasında dokuda oluşan metabolitler sirkülasyon olmadığından dokuda birikir(8,15,21,43).

Kan akımının normale dönmesiyle (reperfüzyon) dokuda birikmiş metabolitlerin oksidasyonu sonucu oluşan maddeler dolaşıma karışır ve kan yolu ile tüm vücuda yayılarak uzak organ hasarından sorumlu olurlar(5,8).

Reperfüzyon, iskemi sonrası iskeminin bıraktığı hasarı artıran bir potansiyele sahiptir. Reperfüzyon hasarı endotelial ve mikrovasküler disfonksiyon, hücrel nekroz ve apoptozla karakterizedir(20,21). İskemik bir dokuda kan akımının yeniden başlaması durumunda özellikle dokuya gelip yerleşen polimorfonükleer lökositler tarafından salınan serbest oksijen radikalleri dokudaki yıkımı artırıcı etki yapar(16). Mikrovasküler disfonksiyon, vasküler permeabilite artışına, bu da iskemik doku ödeme ve dolayısıyla iskeminin şiddetlenmesine neden olur. Geçmiş yıllarda yapılan çalışmalarda, iskemik dokuda vasküler permeabilite artışının, iskemik dokudaki yüksek histamin düzeyleri nedeniyle olduğuna inanılmaktayken, Korthuis

ve arkadaşları, domuz *grasilis* kasında iskemi/reperfüzyon modeli oluşturmuş ve deneklere histaminin, reseptörüne bağlanmasını bloke eden H₁ ve H₂ reseptör blokörleri (difenhidramin, simetidin) vererek, permeabilite artışının yüksek histamin seviyelerine değil; iskemik dokuya göç eden lökositlerden salınan mediatörler ile serbest oksijen radikallerine bağlı olduğunu göstermişlerdir(22).

Reperfüzyon sonrası iskemik dokuya olan sürekli lökosit göçü, iskemi/reperfüzyon hasarına bağlı doku hasarının devamını ve genişlemesini sağlar. Lökositler, proteolitik enzim (elastaz) ve serbest oksijen radikalleri sentezi ve kapiller seviyede mikrodolaşım tıkanıklığı ile hasara katkıda bulunur(5,8,13,15,20).

Bu patolojik olayın ortaya çıkmasından sorumlu tutulan mekanizmalar, serbest oksijen radikalleri (SOR), proinflamatuvar mediatörlerin artması, lökosit infiltrasyonu, kalsiyum yüklenmesi, fosfolipid peroksidasyonu ve azalması, bozulmuş nitrik oksit metabolizması ve azalmış ATP sentezi ileri sürülmüştür(5,8,13,15,20).

2.3. İskemi Reperfüzyon Hasarı Mekanizmaları

İskemik dokunun nekrozdan kurtulması için reperfüzyon şarttır. Ancak reperfüzyon iskeminin dokuda yapmış olduğu hasarı arttırarak nekroz sahasının genişlemesine neden olur. Bu olayların tamamına birden ‘reperfüzyon hasarı’adı verilir. İskemiye maruz kalan her dokuda reperfüzyon hasarı oluşur(23).

2.3.1. Serbest Oksijen Radikalleri(SOR)

Atomlarda elektronlar orbital adı verilen uzaysal bölgede çiftler halinde bulunurlar. Atomlar arasında etkileşim ile bağlar meydana gelmekte ve moleküler yapı oluşmaktadır. Serbest radikal, dış orbitalinde tek sayıda elektron bulunan bir atom veya moleküldür. Dış orbitalde, iki ile bölünmeyen elektron varlığı, atom veya molekülü reaktif kılar. Normalde hücrelerde en büyük serbest oksijen radikali kaynağı mitokondriyal elektron transport zincirinden sızıntıdır. Mitokondri iç zarında yerleşmiş oksidatif fosforilasyon zinciri bileşenleri büyük oranda indirgendiği zaman mitokondriyal süperoksit radikal üretimi artar(24). Canlılığın devamının zorunlu bir parçası olan serbest oksijen radikalleri, sayısız enzimatik reaksiyon ve biyolojik fonksiyon için gereklidir. Ancak, reperfüzyon gibi bazı patolojik durumlarda aşırı miktarlarda ortaya çıkarak hücresele hedeflere zararlı etkilerde bulunurlar. SOR'nin

hücre düzeyindeki en önemli etkileri; lipid peroksidasyonu, protein hasarı, tiyol bileşiklerinin oksidasyonu, DNA hasarı, enzim oksidasyonu, monosit ve makrofajlarda proinflamatuvar sitokin yapımının uyarılmasıdır(24,25,27). Serbest oksijen radikallerinin organizmadaki zararlı etkileri tablo 2.3’de gösterilmiştir(24).

Tablo 2.3. Serbest oksijen radikallerinin zararları

-Hücre organelleri ve membranındaki lipid ve protein yapısını bozarlar.
-Hücre içi yararlı enzimleri etkisizleştirirler.
-DNA'yı tahrip ederler.
-Mitokondrilerdeki aerobik solunumu bozarlar.
-Elastaz, proteaz, fosfolipaz, lipoksinaz, siklooksigenaz, ksantinoksidaz, indolamin dioksigenaz, triptofan dioksigenaz, galaktoz oksidaz gibi litik enzimleri aktive ederler.
-Hücresinin potasyum kaybını arttırırlar.
-Trombosit agregasyonunu arttırırlar.
-Dokulara fagosit toplanmasını kolaylaştırırlar.
-Hücre dışındaki kollajen doku komponentlerini, savunma enzimlerini ve transmitterleri yıkarlar.

Organizmada pek çok türde serbest radikal oluşabilir; ancak en sık olarak lipid yapılarla oluşur. Doymamış yağ asitlerinin alil grubundan bir hidrojen çıkarsa lipid radikali meydana gelir. Oluşan lipid radikali oksijen ile reaksiyona girer ve lipid peroksi radikali oluşturur. Lipid radikallerinin en önemli kaynağı egzersiz yapan iskelet kasıdır(26). Lipid peroksi radikali, diğer lipidlerle zincir reaksiyonu başlatır ve lipidhidroperoksitler oluşur. Ortamda bulunan demir ve bakır iyonları lipid peroksidasyonunu hızlandırır. Lipid radikaller yüksek derecede sitotoksik ürünlere de dönüşebilir. Bunlar arasında en çok bilinen ürün aldehid grubundan malonildialdehid(MDA)(24,27).

Serbest radikallerin başlıca kaynağı moleküler oksijendir. Serbest oksijen radikalleri; mitokondrideki elektron transport sistemi, ksantin oksidaz sistemi, endotelial hücreler, prostaglandin ve aktive nötrofillerden kaynaklanmaktadır(11,13,24). SOR'nin en önemli oluşum mekanizması,

hipoksantin/ksantin oksidaz sistemidir. SOR'den en önemlileri; süperoksit anyonu (O_2^-), hidrojen peroksit (H_2O_2), hidroksil (OH^-) radikalidir(28). SOR, aerobik metabolizma sonucu oluşur ve antioksidan sistemlerce detoksifiye edilir. Oksidan/antioksidan dengenin bozulması, SOR oluşumunu artırır. Reperfüzyon esnasında SOR yapımının artması, enzimatik antioksidan sistemlerin detoksifikasyon kapasitesini aşarsa, doku hasarına giden bir dizi tepkimeler başlar(15,27,29). Organizmadaki serbest radikal kaynakları tablo 2.4'de gösterilmiştir(24).

Tablo 2.4. Serbest radikal kaynakları

Normal biyolojik işlemler (Oksijenli solunum -Katabolik ve anabolik işlemler)
Oksidatif stres yapıcı durumlar (İskemi - hemoraji - travma - radyoaktivite - İntoksikasyon-Ksenobiotik maddeler)
Oksidan enzimler (Ksantin oksidaz- İndolamin dioksigenaz-Triptofan dioksigenaz- Galaktoz oksidaz –Siklooksigenaz- Lipooksigenaz- Monoamino oksidaz)
Stres ile artan katekolaminlerin oksidasyonu
Fagositik inflamasyon hücrelerinden salgılanma (nötrofil, monosit, makrofaj, eosinofil, endotelyal hücreler)
Uzun süreli metabolik hastalıklar
Yaşlanma süreci
Diğer nedenler: Sıcak şoku, güneş ışını, sigara

Birçok enzimin katalitik döngüsü sırasında da serbest radikaller ortaya çıkar. Bu enzimlerden biri ksantin oksidazdır. Ksantin oksidaz hasarlanmamış dokularda bir dehidrojenaz olarak vardır, pürinlerin yıkım yolunda hipoksantinden ksantin, ksantinden de ürik asit oluşumu basamaklarında elektron alıcısı olarak moleküler oksijenden (O_2) daha çok NAD^+ kullanır. Oksijensizliğe bağlı olarak ADP'nin ATP'ye fosforilasyonunun azaldığı durumlarda (iskemi durumlarında), hücre içi iyon konsantrasyonlarında da değişiklikler olur ve hücre içi Ca^{++} konsantrasyonundaki artış nedeniyle, bir enzim kompleksi olan Ca^{++} , uyarılmış proteazları aktive ederek ksantin dehidrojenazı (D tipi), ksantin oksidaz (O tipi) formuna dönüştürür. Ksantin dehidrojenazın, ksantin oksidaz olarak aktivite göstermesi durumunda hipoksantin,

ksantine ve ksantin de ürik aside dönüşürken moleküler oksijen kullanılmakta, moleküler oksijen, hidrojen peroksida indirgenmektedir. İskemi durumlarında oksijen seviyesi düşük olduğundan önemli hasar olmaz. Ancak oksijen seviyesi reperfüzyon sırasında normale dönünce, iskemik dokuda ksantin oksidaz etkisiyle fazla miktarda hidrojen peroksit (H_2O_2) ve süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) oluşur, bunların etkisiyle de iskemi/reperfüzyon hasarı ortaya çıkar(15,28-29). Tablo 2.5’de radikal olan ve radikal olmayan bileşikler gösterilmiştir(24).

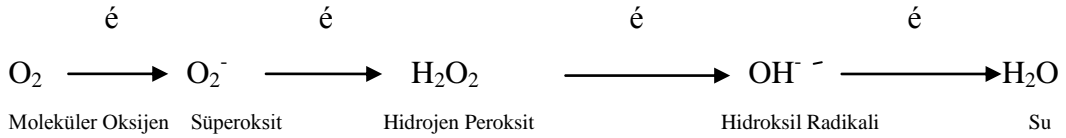
Tablo 2.5. Radikal olan ve radikal olmayan reaktif bileşikler

RADİKALLER	RADİKAL OLMAYANLAR	
Süperoksit radikal ($O_2^{\cdot-}$)	Hidrojen peroksit (H_2O_2)	<i>Singlet</i> oksijen
Hidroksil radikal (OH^{\cdot})	Lipid hidroperoksit ($LOOH$)	
Alkoksil radikal (LO^{\cdot})	Hipoklorik asit ($HOCL$)	
Peroksil radikal (LOO^{\cdot})		

Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$): Süperoksit radikali ($O_2^{\cdot-}$) hemen tüm aerobik hücrelerde moleküler oksijenin (O_2) bir elektron alarak indirgenmesi sonucu oluşur. İndirgenmiş geçiş metallerinin oto oksidasyonu süperoksit radikali meydana getirebilir. Süperoksit radikali kendisi direkt olarak zarar vermez. Bu radikal anyonun asıl önemi, hidrojen peroksit kaynağı olması ve geçiş metalleri iyonlarının indirgeyicisi olmasıdır. Süperoksit radikali düşük pH değerlerinde daha reaktiftir, oksidan perhidroksi radikali (HO_2^{\cdot}) oluşturmak üzere protonlanır. Süperoksit radikali ile perhidroksi radikali birbirleriyle reaksiyona girince, biri okside olur diğeri indirgenir. Bu dismutasyon reaksiyonunda, moleküler oksijen ve hidrojen peroksit meydana gelir. Süperoksit radikalının fizyolojik bir serbest radikal olan nitrik oksit (NO^{\cdot}) ile birleşmesi sonucu bir reaktif oksijen türü olan peroksinitrit ($ONOO^{\cdot}$) meydana gelir. Peroksinitrit, nitrit ($NO_2^{\cdot-}$) ve nitrat ($NO_3^{\cdot-}$) oluşturmak üzere metabolize edilir. Peroksinitrit, azot dioksit (NO_2^{\cdot}), hidroksil radikali (OH^{\cdot}), nitronyum iyonu (NO_2^{\cdot}) gibi toksik ürünlere dönüşebilir ki, nitrik oksitin (NO^{\cdot}) zararlı etkilerinden peroksinitrit sorumludur (29).

Hidrojen peroksit (H_2O_2): Hidrojen peroksit (H_2O_2), süperoksidin çevresindeki moleküllerden bir elektron alması veya moleküler oksijenin çevresindeki moleküllerden iki elektron alması sonucu oluşan peroksitin, iki proton (H^+) ile birleşmesi sonucu meydana gelir. Biyolojik sistemlerde hidrojen peroksitin asıl üretimi, süperoksidin (O_2^-) dismutasyonu ile olur. İki süperoksit molekülü, süperoksitin dismutasyonu reaksiyonunda iki proton alarak hidrojen peroksit ve moleküler oksijeni oluştururlar. Bu reaksiyon, radikal olmayan ürünler meydana getirdiğinden dismutasyon reaksiyonu olarak bilinir; ya spontan gerçekleşir ya da süperoksit dismutaz(SOD) enzimi tarafından katalizlenir. Spontan dismutasyon, pH 4,8'de en hızlıdır; enzimatik dismutasyon ise spontan dismutasyonun nispeten yavaş olduğu nötral ya da alkali pH'da daha belirgindir. Hidrojen peroksit bir serbest radikal olmadığı halde reaktif oksijen türleri(ROS) kapsamına girer ve serbest radikal biyokimyasında önemli bir rol oynar. Çünkü Fe^{++} veya diğer geçiş metallerinin varlığında Fenton Reaksiyonu sonucu, süperoksit radikalinin (O_2^-) varlığında Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu en reaktif ve zarar verici serbest oksijen radikali olan hidroksil radikali (OH^-) oluşturur. Süperoksit radikalının lipide çözünebilirliği sınırlı olduğu halde hidrojenperoksit lipid çözünebilir. Bu nedenle hidrojenperoksit kendisinin olduğu yerden uzakta olan, fakat Fe^{++} içeren membranlarda hasar oluşturabilir(29).

Hidroksil radikali (OH^-): Hidroksil radikali (OH^-), Fenton Reaksiyonu ve Haber-Weiss Reaksiyonu sonucu hidrojen peroksitten oluşmaktadır. Ayrıca suyun yüksek enerjili iyonize edici radyasyona maruz kalması sonucunda oluşur. Hidroksil radikali son derece reaktif bir oksidan radikaldir; yarılanma ömrü çok kısadır. Hidroksil radikali olasılıkla reaktif oksijen türlerinin en güçlüsüdür. Oluştığı yerde tiyoller ve yağ asitleri gibi çeşitli moleküllerden bir proton kopararak tiyil radikalleri (RS^-), karbon merkezli organik radikaller (R^-), organik peroksitler ($RCOO^-$) gibi yeni radikallerin oluşmasına ve sonuçta büyük hasara neden olur(29). Şekil 2.2'de moleküler O_2 'den Haber- Weiss Reaksiyonu ile serbest radikal oluşumu gösterilmiştir(29).



Şekil 2.2. Haber- Weiss Reaksiyonu ile moleküler oksijenin tek değerlikli indirgenmesi sonucu SOR oluşumu

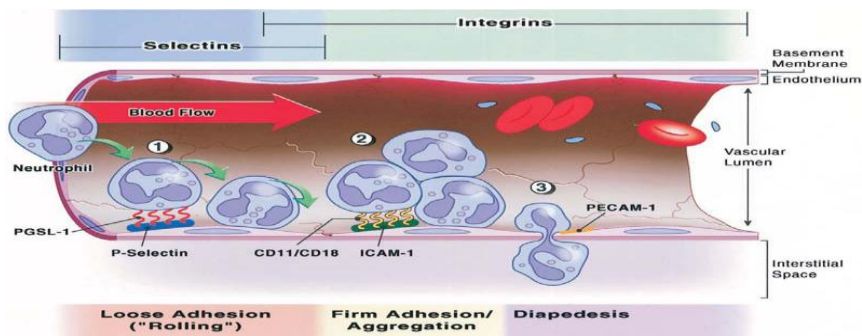
Postiskemik dokularda SOR'nin kaynağı ksantin oksidaz ve nötrofilik NADPH oksidaz sistemidir. Oluşan SOR'ni ortadan kaldıran en önemli enzim ise süperoksit dismutaz(SOD)'dır. SOD, O_2^- radikalini, reaktivitesi ve membrandan geçişi daha düşük olan H_2O_2 'ye dönüştürür. SOD enzimi SOR'ne karşı ilk enzimatik savunma sistemidir. Memelilerde en yüksek SOD enzim aktivitesi karaciğer, beyin, böbrek, adrenal bez ve kalp dokusunda tesbit edilmiştir(30).

2.4. İskemi Reperfüzyon Hasarında Lökosit ve Endotel Etkileşimi

İskemi reperfüzyon hasarında aktif hale gelen ilk hücre nötrofil olup hasarın ana hücrelerindedir. Mikrovasküler ve doku hasarının çoğundan sorumlu son mekanizma oldukları düşünülmektedir(6,19,20). İskemi/reperfüzyon hasarında lökositlerin etkinliğinin araştırıldığı çalışmalarda; antinötrofil serum, antitümör ajanlar, x-ışını radyasyonu ile lökopenik bırakılan hayvanlarda oluşturulmuş iskemi/reperfüzyonda hasarın çok daha az olduğu tespit edilmiştir(20,31,32). Her ne kadar nötrofiller iskemi/reperfüzyon hasarında ana rolü üstlense de; kemik iliği kaynaklı T lenfosit, monosit, trombosit gibi diğer hücrelerin de, iskemi/reperfüzyon hasarında rolleri bulunmaktadır. Lökositler ve trombositler, endotel hücreleriyle etkileşimde bulunarak nötrofil aracılı iskemi/reperfüzyon hasarının oluşmasına katkıda bulunurlar(6,19,33). İskemi reperfüzyon; endotel ve lökosit hücre yüzeyleri adezyon molekül oluşumunu artırarak lökosit diapedeziyle sonuçlanan olaylar zinciri aktivasyonuna neden olur(19,20). Doku iskemisi sonrası dokudan açığa çıkan (trombosit, endotel hücreleri ve nötrofillerden) kemotaktik sinyaller, nötrofil adezyon ve diapedez sürecinin düzenli şekilde gerçekleşmesine neden olurlar. Dolaşımda bulunan nötrofiller aktive olduklarında, iskemik doku endoteline yapışıp interstisyel alana geçerler(5,6,19,20,34).

Serbest oksijen radikalleri; kemotaktik stimulanların oluşumunu artırarak (PAF, LTB₄), kompleman aktivasyonunu gerçekleştirerek, adezyon moleküllerinin ekspresyonunu artırarak, antiadhesiv molekül olan nitrik oksitin yıkımını artırarak lökosit infiltrasyonuna neden olurlar(20).

Aktive olmuş lökositler; salıverdikleri serbest oksijen radikalleri, sitotoksik enzimleri ve mikrosirkülasyonda oluşturdukları obstrüksiyonla hasara katkıda bulunurlar. Lökositlerin iskemi reperfüzyon periyodundan sonra çizgili kasta biriktiği gözlenmiştir(19,31,35). Lökositlerin dokuya nüfuz edebilmelerinin ön koşulu endotel hücrelerine yapışmalarıdır (Adezyon). Başlangıçta lökositler ve aktive olmuş endotel hücreleri arasında oluşan adezyona E-selektin, P-selektin ve L-selektin aracılık eder. Bu şekilde adezyona uğramış lökositler C5a, Lökotrien B₄(LTB₄), interlökin 8(İL-8) ve platelet aktive edici faktör (PAF) aracılığı ile aktive edilirler ve yüzeylerinde CD11b (Mac-1) ve CD18 molekülleri belirir. CD11b/18 ve ayrıca ICAM-1 etkinliği sonucu daha önce oluşan adezyon güçlenir ve transendotelial migrasyon oluşur(5,6,19,20,31,37). Sonrasında; endotel hücreleri arasından geçen lökositler hedef dokuya göç ederler (Diapedez). Lökosit göçü esas olarak venöz kılcallardan olur. Lökositler bu göç esnasında endotel bazal membranında bir süre duraklarlar. Lökositlerden salgılanan kollajenazlar, bazal membran parçalanması ve lökositlerin interstisyel alana geçişlerinde önemli rol oynar. Hasarlı dokuya olan lökosit kemotaksisi C5a (kompleman sistemi unsuru), LTB-4 (Araşidonik asit lipoksigenaz yolu ürünleri), İL-8 (Sitokin) yoluyla sağlanır(5,20). İskemi reperfüzyon sırasında oluşan TNF α , İL 1 β , PAF ve kompleman sistemi gibi inflamatuvar araçların hepsi lökosit göçünü artırır(38). Şekil 2.4'de lökositlerin damar duvarından dokuya geçişi gösterilmiştir(16).



Şekil 2.3 İskemi reperfüzyon hasarında lökosit-endotel etkileşimi

Hasarlanmış bölgede biriken hücre tipi inflamasyonun süresi ve uyarının tipine göre değişir. İskemi reperfüzyon hasarına inflamatuvar cevapta ilk 6-24 saat nötrofil hakimiyeti mevcut iken, 24-48 saatlerde monositler baskın hale geçerler. Bunun nedeni nötrofillerin kanda fazla bulunması, daha hızlı aktive olmaları, adezyon moleküllerine yüksek afinite ile bağlanmaları ve yarı ömürlerinin kısa olmasıdır. Dolayısıyla akut dönemde nötrofil, kronik dönemde monosit hakimiyeti vardır(13). Tüm bu basamaklar sonucunda lökositler dokuda hasarın genişlemesine neden olurlar. Bu durumun klinik yansıması mikrovasküler tromboz ve disfonksiyon ile karakterize “*no-reflow*” fenomenidir(20).

2.5 Mikrodolaşım ve No-Reflow Fenomeni

Mikrodolaşım, en uç kan dolaşım sistemidir. *No-reflow fenomeni*, diğer bir nötrofil aracılı hasardır(39). İskemi sonrası reperfüzyon periyodunda iskemik dokuda ilk biriken hücreler trombositlerdir. Bunlar endotel aktivasyonuna ve lökosit birikimine katkıda bulunurlar(20,33). Aktive olmuş lökositler inflamatuvar yanıt oluşmasına neden ve mikrodolaşımda birikerek kollaps ve tıkanıklığa neden olurlar. Dolayısıyla lökosit-trombosit ve lökosit-endotel hücre etkileşimleri ana mekanizma olup, interstisyel sıvı birikimi ve azalmış endotel bağımlı vazodilatasyon bu duruma katkıda bulunur(20,40). Lökosit-endotel etkileşimi endotelde şişme ve daha çok lökosit adezyonuyla sonuçlanır. Lökosit-trombosit adezyonu ise trombositlerin subendotel alanda birikerek, endotel ayrılmasına neden olur. Biriken trombositler daha fazla lökosit etkileşimine neden olur(40). Sonuç olarak endotel-lökosit-trombosit etkileşimleriyle fibrin birikimini takiben trombüs oluşumu gözlenir.

2.6. Kompleman Sisteminin Rolü

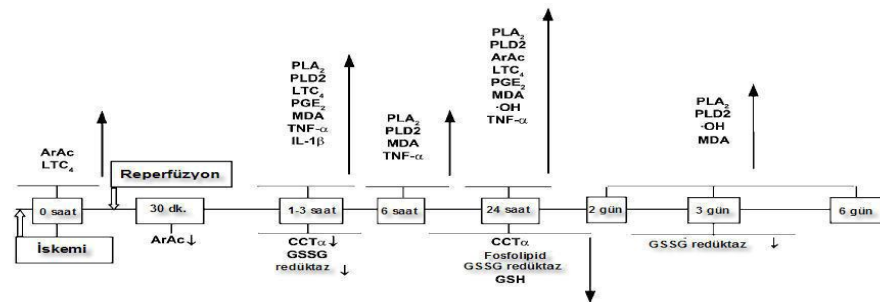
Kompleman sistemi, fonksiyonu organizmadan patojenleri temizlemek olan biyolojik olaylar dizisi sistemidir. Kompleman sisteminin üç ayrı aktivasyon şekli vardır. Bunlar klasik, alternatif ve mannoz bağımlı aktivasyon yollarıdır(41). Son bilgiler göstermektedir ki; iskemi, hücre yüzeyinde iskemi antijeni adında, IgM ile reaksiyon veren yeni antijenlerin oluşumuna neden olmaktadır. Bu yeni antijen ve ona bağlı IgM'den oluşan kompleks, C₁ ile bağlanmakta ve böylece kompleman sisteminin aktivasyonu sağlanarak C_{3a} ve ardından C_{3b} oluşmaktadır. C_{3b}, geride

kalan kompleman kaskadını aktive ederek, Membran saldırı kompleksi (MAC) oluşumuna neden olmaktadır. MAC, hücre zarına porlar açarak hücrenin imhasını sağlamanın yanında hasarın birincil mediatörüdür. Ayrıca MAC, araşidonik asit metabolizmasını aktive ederek makrofajlardan prostaglandin E₂, nötrofillerden lökotrien B₄, tromboksan B₂, prostanoidler, interlökin-1 ve serbest oksijen radikallerinin salınımına yol açarak yangısal cevabın artmasına neden olmaktadır(41).

İnsanlarda, alt ekstremitte iskemisinde kompleman aktivasyonu serum C_{3a} ve C_{5a} değerlerinin ölçülmesiyle tayin edilir. Kompleman inhibitörleri kullanılarak C₅ eksikliği yapılmış farelerde oluşturulan iskelet kası iskemi/reperfüzyon hasarında; uzak organ hasarı (akciğer, karaciğer, böbrek.); serum kreatin kinaz (CK), myeloperoksidaz (MPO) ve alanin aminotransferaz (ALT) değerlerindeki azalma ile gösterilir (41).

2.7. Sitokinler

Sitokinler, hücreler arası iletişimi sağlayan aracı maddelerdir. Sitokinler, salgılandığı hücrenin embriyolojik kaynağına göre farklılık gösteren polipeptid yapıda çok geniş bir ailedir. Sitokin terimi ayrıca, immunomodülatör ajanlar olan interlökinler ve interferonları da tanımlamak için kullanılır. Literatürde; interlökin-1 (IL₁), interlökin-6 (IL₆), tromboksan A₂ (TXA₂) ve doku nekroz faktörü (TNF)'nin etkileri, iskemi/reperfüzyon hasarı için iyi tanımlanmıştır. Bu sitokinler; lökositler ve vasküler endotel bariyeri arasında sinyal görevi üstlenerek lökositlerin selektif adezyon ve migrasyonunu sağlamaktadır(41). Şekil 2.5'de iskemi/reperfüzyon hasarında salgılanan mediyatörler gösterilmiştir(21).



Şekil 2.4 iskemi/reperfüzyon hasarında salgılanan mediyatörler

2.8. Nitrik Oksit (NO)

Nitrik oksit, L-Arginin'in guanidium grubundan, Nitrik oksit sentetaz(NOS) enzimi aracılığı ile endotelde sentezlenen diatomik serbest radikaldır. Üç farklı NOS enzimi vardır. Her üç formda NADPH kullanır(5). Endotelial nitrik oksit sentaz(eNOS – tip3), nöronal nitrik oksit sentaz(nNOS – tip1) ve üçüncüsünde normal koşullarda üretilmeyen ancak enflamasyon veya enfeksiyon durumlarında sitokinler veya endotoksinler tarafından indüklenebilen nitrik oksit sentaz(iNOS – tip2)'dir. eNOS ve nNOS enzimleri Ca^{++} /kalmodulin bağımlı iken; iNOS, Ca^{++} bağımsızdır. eNOS tarafından üretilen NO, vasküler düz kaslar için en güçlü vazodilatatördür. Nitrik oksit, iskemi reperfüzyon hasarına karşı oldukça iyi bilinen koruyucu ve mediatördür(26,29,30,37).

Nitrik oksit vasküler tonusun fizyolojik regülasyonu, trombosit agregasyonunun inhibisyonu, endotele lökosit adezyonunun engellenmesi, serbest oksijen radikallerinin temizlenmesi, normal vasküler permeabilitenin idamesi, düz kas proliferasyonunun engellenmesi, immun defansın güçlendirilmesi, endotel hücrelerinin rejenerasyonu gibi birçok yaşamsal olayda etken bir maddedir(42). Aynı zamanda iskemik dokularda süperoksit dismutaz aktivitesini etkileyerek hidrojen peroksit birikimini azaltır(43). İskemi reperfüzyon hasarına bağlı gelişen endotel hücre disfonksiyonunda, nitrik oksit sentezinde azalma oluşarak hücre hasarı derinleşir. Endotel disfonksiyonuna bağlı nitrik oksit azalma mekanizması hala tam olarak gösterilememiştir.

2.9. Ekstremitte İskemi Reperfüzyon Fizyopatolojisi ve Uzak Organ Hasarı

İskemik hasar; esas olarak oksijenden yoksun hücre ölümüyle sonuçlanırken, reperfüzyon geniş bir yelpazede inflamatuvar yanıtlar oluşturarak hem lokal hasara, hem de sistemik etkileri ile, sistemik inflamatuvar yanıt sendromu(SİYS) ve çoklu organ yetersizliği sendromu(ÇOYS) gibi oldukça ağır ve ölümcül tablolara yol açabilir. Günümüzde cerrahi girişimler ve travmayı takiben gelişen ÇOYS'nun, lokal doku hasarı sonucu oluşan sistemik reaksiyonun bir sonucu olduğu fikri yaygın kabul görmüştür. Bu reaksiyon, bir dizi inflamatuvar mediyatörün üretimi ile birlikte hücrel ve humoral konak yanıtlarının aktivasyonunu içermektedir. Reperfüzyon sonucu oluşan değişiklikler; iskemik hasardakilere kıyasla farklılıklar sergiler.

Uzamış iskemi ile iskemi/reperfüzyonun karşılaştırıldığı çalışmalarda, sadece uzamış iskemiye bağlı hücre ölümü oranı %17 olarak bulunurken, bu oranın reperfüzyon ile % 73'e çıktığı belirlenmiştir(44).

İskelet kası; hem en büyük kütle olması, hemde iskemik hasara en hassas dokulardan olması nedeniyle alt extremitte iskemi reperfüzyon hasarında önemli rol oynar. Alt extremitte iskemi reperfüzyon hasarında, mikrovasküler disfonksiyon ve kas değişiklikleri birbirleriyle paralel seyretmekte olup, prognoz kas hasarı miktarına bağlıdır. Reperfüzyonla oluşmuş inflamatuvar yanıt, geri dönüşümlü zedelenme miktarı ile doğru, nekrotik kas miktarı ile ters orantılıdır. Antitrombotik ve antienflamatuvar tedaviyle geri dönüşümlü zedelenmiş bölgedeki mikrovasküler disfonksiyon hedeflenir(45).

Alt extremitte iskemi reperfüzyon hasarında lokal ve sistemik etkiler gözlenir. Lokal etkiler iskelet kası ve damar endotelinde gözlenirken, sistemik etkiler başlıca akciğer, böbrek, santral sinir sistemi, gastrointestinal sistem ve myokard disfonksiyonu gibi çoklu organ yetmezlikleri şeklinde de görülebilir(10,48,49).

Akciğer dokusu alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarından en çok etkilenen hedef organdır. Oluşan sistemik inflamasyon hemen her organda hasar oluşturabilir; ancak ilk gözlenen uzak organ hasarı, 24-72 saat içinde oluşan akciğer yetmezliğidir ve bazı olgularda uzamış ventilatör ve inotropik destek gereksinimine, dolayısıyla da mortaliteye neden olabilmektedir(46,47).

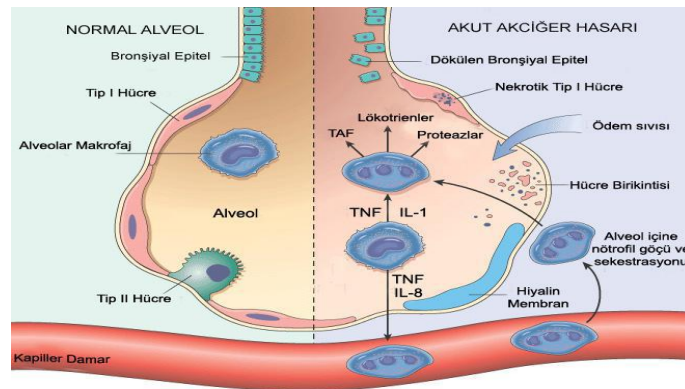
2.10. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Akciğerlere Olan Etkisi

Akciğerlerde, esas olarak serbest oksijen radikalleri ve aktive nötrofiller tarafından oluşturulan hasar, akciğer damarsal yapılanmasındaki geçirgenlik artışına bağlı oluşan akut solunum yetersizliği tablosuyla karakterlidir(50,51).

İskemik dokuların reperfüzyonu sonrası pulmoner kapiller yatak, bir filtre gibi görev yapar. Vasküler staz esnasında oluşan trombosit mikroagregatları, reperfüzyondan sonra akciğerlerde tutulur. Ancak, akciğerlerde iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturmak için plazma kofaktörleri de dolaşımda bulunmalıdır(30,45). Moleküler olarak akut alt ekstremitte I/R hasarı sonrası vücutta lokal ve sistemik inflamatuvar bir yanıt ortaya çıkmakta ve buna bağlı plazmada artmış pro-inflamatuvar ajanlarla (sitokinler, arasıdonik asit deriveleri, trombosit aktive edici faktör,

kompleman gibi) birlikte, artmış serbest oksijen radikalleri ve nötrofil infiltrasyonu uzak organ hasarında rol oynamaktadır(30,52).

Akciğer hasarının temelinde, iskemik doku tarafından uyarılmış mediyatörler ile aktive edilmiş nötrofillerin pulmoner yatakta birikimi ile karakterli nötrofil sekestrasyonu ve aktive nötrofiller tarafından salınan serbest radikallerin neden olduğu endotel hücre hasarı bulunmaktadır. İskelet kasının iskemi/reperfüzyonu sonrasında nötrofillerin seçici olarak akciğerlerde birikmesinden sorumlu olan mekanizma açık değildir. Postiskemik ekstremite kasları tarafından üretilen proinflamatuvar sitokinlerin; nötrofillerin ya da uzak organ endotelinin yüzeyindeki adezyon moleküllerini arttırarak nötrofillerin karşılaştıkları ilk mikrovasküler yatakta sekestre olmalarına yol açtıklarını öne süren mekanizma, en olası mekanizma gibi görünmektedir. Plazmada bulunan proinflamatuvar ajanlardan kompleman faktörleri, sitokinler (IL-6, IL8, TNF), trombosit aktive edici faktör ve lökotrienler de endotel hücre hasarına sebep olmaktadır. Pulmoner vazokonstrüksiyon, hipoksemi, kompliansta azalma, pulmoner hipertansiyon ve artmış pulmoner vasküler geçirgenliğe bağlı non-hidrostatik akciğer ödemi, endotel hücre fonksiyonunun bozulması nedeniyle oluşur. Bu subklinik bir tablodan akut respiratuvar distres sendromu(ARDS)'na kadar değişen bir klinik spektrum gösterebilir(30,45,47,52-55). Şekil 2.6'da akut akciğer hasarında, nötrofillerin akciğer dokusuna sekestre olmaları ve burada sitokinlerin etkisiyle aktive olarak nötrofil aracılı akciğer hasarını başlatmaları gösterilmektedir(13).



Şekil 2.5 Akut akciğer hasarında hasarlı alveol ile normal alveolün (sol taraf) karşılaştırması

Alt ekstremite iskemisi sonrasında TNF- α , IL-1 ve IL-6 düzeylerinin serumda, akciğer ve böbrek gibi sistemik organlarda arttığı gösterilmiştir(56). Bu sitokinler arasında özellikle TNF- α ve IL-1 β Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu(SIYS)'nun esas mediyatörleri iken, IL-6 inflamasyondaki ve bağışıklık yanıtındaki akut faz protein reaksiyonunun düzenlenmesinden sorumlu ana mediyatör gibi görünmektedir(57). IL-6, hücre adezyonunu uyardığı gibi endotelial geçirgenliği de artırır ve sistemik olarak kolaylıkla saptanabilir(58). TNF- α , kapillerlerin geçirgenliğini artırarak akciğer ödemine ve metabolik asidoza neden olabilir. Farklı organlardaki İ/R hasarının patogeneğinde TNF- α 'nın ana rol oynadığı gösterilmiştir. Ayrıca, sıçanlardaki alt ekstremite İ/R modellerinde yapılan birçok çalışma, İ/R'dan sonra görülen akciğer hasarının patogeneğinde TNF- α 'nın önemli rol oynadığını bildirmektedir(30,59-61).

İşbir ve ark.(53)'nin belirttiğine göre Zimon ve arkadaşları, akut alt ekstremite iskemisi gelişen ve cerrahi tedavi uygulanan 70 hastada, erken postoperatif dönemde %64 oranında pulmoner komplikasyon bildirmişler ve pre-operatif iskemi süresi ile oluşan akciğer hasarının şiddeti arasında belirgin bir korelasyon görmüşlerdir.

2.11. İskemi/Reperfüzyon Hasarında Tedavi Seçenekleri ve Antioksidanlar

Yaşamın sağlıklı bir şekilde devamı için pro-oksidan/antioksidan sistemler denge içinde çalışmalıdır. Organizmalar, serbest oksijen radikallerinin zararlı etkilerine karşı birçok savunma sistemi geliştirmişlerdir. Bu antioksidan savunma sistemleri; superoksit dismutaz, katalaz, glutatyon peroksidaz gibi enzimleri; albumin, seruloplazmin, ferritin gibi makromolekülleri; askorbik asit, α -takoferol, β -karoten, ubiquinol-10, glutatyon, methionin, ürik asit ve bilirubin gibi küçük molekülleri içermektedir(62).

SOR'nin oluşumu ile meydana getirdikleri hasarları önlemek ve detoksifikasyonu sağlamak üzere organizmayı koruyan antioksidan savunma sistemi dört yolla etki göstermektedir: Serbest oksijen radikallerini etkileyerek onları tutma, yok etme, süpürücü etkidir. Antioksidan enzimler ve küçük moleküller bu yolla etki gösterirler. Serbest oksijen radikalleriyle etkileşip onlara bir hidrojen aktararak aktivitelerini azaltma inaktif şekle dönüştürücü etkidir. Vitaminler, flavanoidler inaktif hale dönüştürerek etki gösterirler. Serbest oksijen radikallerini bağlayarak

zincirlerini kırıp fonksiyonlarını engelleyici etki, zincir kırıcı etkidir. Hemoglobin, seruloplazmin ve mineraller, zincir kırıcı etki gösterirler. Serbest radikallerin oluşturdukları hasarın tamiri onarıcı etkidir. Endojen kaynaklı veya eksojen kaynaklı olan antioksidanların tanımlanmasında ve etkinliklerinin ortaya konmasında İ/R hasarı modelleri önemli katkı sağlamıştır. Antioksidan özelliği öne sürülmüş pek çok madde çeşitli İ/R modellerinde test edilerek değerlendirilmiştir. Antioksidanlar endojen antioksidanlar ve eksojen antioksidanlar olmak üzere iki ana gruba ayrılır. Endojen antioksidanlar enzim olan ve enzim olmayan endojen antioksidanlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar(26,28,30). Enzim olan endojen antioksidanlar tablo 2.7'de gösterilmiştir(30). Enzim olmayan endojen antioksidanlar tablo 2.9'da gösterilmiştir(30). Eksojen antioksidanlar vitamin olan eksojen antioksidanlar ve ilaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar olmak üzere iki alt gruba ayrılırlar(26,28,30). Vitamin olan eksojen antioksidanlar tablo 2.9'da gösterilmiştir(30). İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar tablo 2.10'da gösterilmiştir(30).

Tablo 2.6. Enzim olan endojen antioksidanlar

ENZİMLANENDOJENANTİOKSİDANLAR
Süperoksit dismutaz (SOD)
Glutasyon peroksidaz (GSHPx)
Glutasyon S-Transferaz (GST)
Katalaz
Mitokondriyal sitokrom oksidazsistemi, Hidroperoksidaz

Tablo 2.7. Enzim olmayan endojen antioksidanlar

ENZİM OLMAYAN ENDOJEN ANTİOKSİDANLAR		
Melatonin	Sistein	Metiyonin
Seruloplazmin	Hemoglobin	Albumin
Transferin	Laktoferrin	Miyoglobin
Bilirubin	Ferritin	Glutasyon

Tablo 2.8. Vitamin olan endojen antioksidanlar

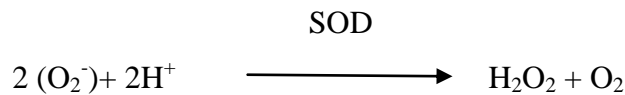
VİTAMİN OLAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR
α -tokoferol (vitamin E)
β -karoten
Askorbik asit (vitamin C)
Folik asit (folat)

Tablo 2.9. İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar

İLAÇ OLARAK KULLANILAN EKSOJEN ANTİOKSİDANLAR
Ksantin oksidaz inhibitörleri (allopürinol, oksipürinol)
NADPH oksidaz inhibitörleri (adenozin, lokal anestezipler)
Rekombinant süperoksit dismutaz
Trolox-C (vitamin E analogu)
Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (ebselen ve asetilsistein)
Nonenzimatik serbest radikal toplayıcılar (mannitol, albümin)
Demir redoks döngüsü inhibitörleri (desferroksamin)
Nötrofil adezyon inhibitörleri
Sitokinler (TNF ve IL-1)
Barbitüratlar
Demir şelatörleri.

Süperoksit dismutaz (SOD):

Süperoksit dismutaz (SOD) süperoksit serbest radikalının (O_2^-) hidrojen peroksit (H_2O_2) ve moleküler oksijene (O_2) dönüşümünü katalizleyen antioksidan enzimdir.

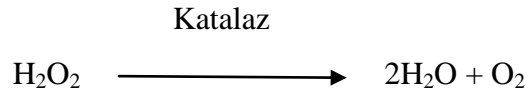


Normal metabolizma sırasında hücreler tarafından yüksek oranda O_2 üretilmesine rağmen hücre içi düzeyi SOD tarafında düşük tutulur. Ancak H_2O_2 ,

geçiş metalleri varlığında Fenton ve Haber Weiss Reaksiyonu ile son derece aktif OH⁻ radikaline dönüşmektedir. Bu durumda CAT ve GSH-Px enzimlerinin aktivitesi artarak H₂O₂ düzeylerini kontrol altına almaktadır(20,26-28,30,37).

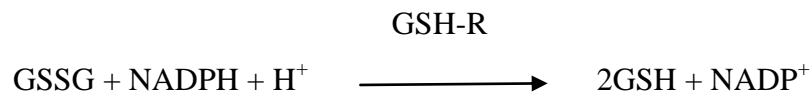
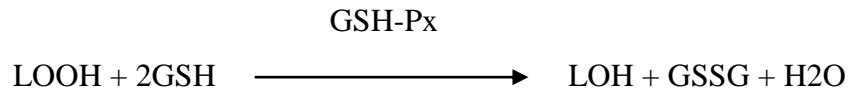
Katalaz:

Katalaz esas olarak peroksizomlarda, daha az olarak sitozolde ve mikrozomal fraksiyonda bulunur. H₂O₂'yi oksijen ve suya parçalar. Böylece H₂O₂'nin OH⁻ oluşumunu önlemek için ortadan kalkmasını sağlar(20,26-28,30).



Glutasyon peroksidaz (GSH-Px) ve glutasyon redüktaz (GSH-R):

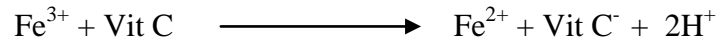
Gerek H₂O₂ ve gerekse LOOH'leri metabolize etmektedir. Selenyum-bağımlı ve selenyum-bağımsız iki farklı tipi vardır. Selenyum bağımlı tipi H₂O₂ ve LOOH'leri, selenyum bağımsız tipi sadece LOOH'leri metabolize eder. Bu reaksiyonlar esnasında GSH hidrojen verici olarak görev yaptığından H₂O₂ ve LOOH indirgenirken GSH ise okside şekline (GSSG) dönüşür. Okside glutasyon ise NADPH bağımlı glutasyon redüktaz (GSH-R) tarafından tekrar GSH'a indirgenir.



Oluşturduğu bu koruyucu reaksiyonlar sırasında kendisi radikal formuna dönüşse de, askorbik asit, glutasyon ve koenzim Q₁₀ (ubikinon) tarafından tekrar aktif haline dönüştürülür. Vitamin E, selenyum metabolizmasında da önemli rol oynar; selenyumun organizmadan kaybını önleyerek veya onu aktif şekilde tutarak selenyum ihtiyacını azaltır. Serbest radikallerin kanserin başlamasında rol aldığı ve vitamin E ile diğer antioksidanların antikanserojen etki göstererek kanserin yayılmasını ve tümörün büyümesini önlediği gösterilmiştir (20,26-28,30,37).

Vitamin C (askorbik asit):

Vitamin C (askorbik asit) suda çözünen en güçlü antioksidan moleküldür. İnsanlarda sentez edilmediğinden diyetle alınması gerekir. Organizmada kolayca, dehidroaskorbik aside oksitlenebilir. O_2^- , HO^- , *singlet* oksijen ile kolayca reaksiyona girerek onları etkisizleştirir. C vitamini; kornea, lens, aköz hümör, adrenal, hipofiz, beyin, kalp, karaciğer, dalak, böbrek ve pankreasta yüksek miktarda bulunur. Yeşil renkli taze sebze, meyve ve turunçgiller önemli C vitamini kaynaklarıdır. C vitamini antioksidan etkisi yanında oksidan etki de gösterir. Askorbik asit, proteine bağlı ferrik demiri uzaklaştırarak ya da doğrudan indirgeyerek Fenton reaksiyonunda hidrojen peroksit ile etkileşmeye ve sonunda hidroksil radikali (OH^-) oluşturmaya uygun ferröz demire dönüştürür. Bu özelliğinden dolayı vitamin C, serbest radikal reaksiyonlarının önemli bir katalizörü veya bir prooksidan olarak değerlendirilir. Ancak bu tip etkisinin sadece düşük konsantrasyonlarda görüldüğü, yüksek konsantrasyonlarda güçlü bir antioksidan olarak etki ettiği kaydedilmiştir. Vitamin C'nin fagositoz için de önemli olduğu gösterilmiştir(7,13,30,63,67).



Bu şekilde oluşan C vitamini radikali çok reaktif değildir, NADH tarafından indirgenir, ya da iki proton alarak serbest radikal reaksiyonlarını durdurur.

Karotenoidler:

Vitamin A'nın ön maddesi olan β -karotenin *singlet* oksijeni bastırabildiği, süperoksit radikalini temizlediği ve OH^- , alkoksil ve peroksil radikalleriyle direkt olarak etkileşerek antioksidan görev gördüğü ve lipit peroksidasyon zincir reaksiyonunu önleyebildiği saptanmıştır. *Singlet* O_2 uzaklaştırıcı olarak bilinen en güçlü karotenoid, Likopendir(28,30,37).

Ürik asit: Pürin metabolizmasında son ürün olarak oluşan ürik asit, insan dokularında urat oksidaz bulunmadığı için birikir. Ürik asit *singlet* O_2 , peroksil radikalleri, ozon ve HOCl için güçlü bir temizleyicidir ve endojen bir antioksidan olarak kabul edilir(28,30,37).

Taurin:

Organizmada sistein ve metiyoninden sentez edilen taurin, protein yapısına katılmaz ve dokuda serbest olarak bulunur. Taurin birçok biyolojik etkilerinin yanında oksidan bir bileşik olan HOCl'yi N-klorotaurine dönüştürerek hücre içinde oksidan hasar oluşmasını engeller(28,30,37).

Melatonin:

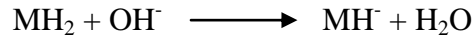
Melatonin, memelilerde başta pineal bez olmak üzere over, lens ve kemik iliği hücreleri ile safra ve gastrointestinal sistemden sentezlenip salgılanan bir hormondur. Melatonin güçlü bir radikal süpürücüsü olduğu gibi, radikaller üzerinde dolaylı etkilere de sahiptir. Melatonin, hidroperoksitleri metabolize eden GSH-Px enzimini aktive ederek, O₂ radikalini H₂O₂'ye kataliz eden SOD aktivitesini artırarak, oksidatif stres esnasında katalaz aktivitesindeki azalmayı önleyerek ve NO oluşumundan sorumlu nitrik oksit sentaz (NOS) enzimini inhibe ederek antioksidan etki göstermektedir(13,46).

Diğer antioksidanlar:

Bilirubin, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısı, albümin ise LOOH ve HOCl toplayıcısıdır. Seruloplazmin olasılıkla SOD'a benzer mekanizmayla etki gösterir. Ferröz demiri (Fe⁺⁺) ferrik demire (Fe⁺⁺⁺) dönüştürerek fenton reaksiyonunu ve böylece hidroksil radikali oluşumunu inhibe eder. Transferrin ve laktoferrin, dolaşımdaki serbest demiri, ferritin ise dokudaki demiri bağlar. Sistein, süperoksit ve hidroksil radikali toplayıcısıdır. Ebselen; selenyumlu bir bileşiktir, GSHPx aktivitesini güçlendirir ve lipoksijenaz yolunu inhibe eder. Sitokinler başta katalaz olmak üzere antioksidan enzimleri aktive ederler ancak proteolitik enzimleri de aktive ettikleri için zararlı olabilirler. Demir şelatörleri, hücre içine girerek serbest demiri bağlamak suretiyle onu etkisizleştirirler; böylece fenton reaksiyonunu ve sonuçta hidroksil radikali oluşumunu inhibe ederler. Bu özelliklerinden dolayı reperfüzyonda kullanılmalarının faydalı olduğu kaydedilmiştir. Desferroksamin, serbest Fe⁺⁺⁺'ü bağlar. Oksipürinol, allopürinolün metabolitidir, doğrudan hidroksil radikali ve hipokloriti azaltıcı yönde etki eder. Mannitol, hidroksil radikalini toplayıcı etki gösterir. Kan kolesterolünü düşürmede kullanılan probukolun lipid peroksidasyonu zincir reaksiyonunu kırıcı etkisi vardır(30,37).

2.12 Mannitol

Mannitol; serbest radikal toplayıcı, mikrodolaşımı yeniden düzenleyici, diüretik ve ozmotik etkileri olan, C₆H₁₄O₆ yapısında monosakkarit alkoldür ve iskemi/reperfüzyon hasarında önemli fizyopatolojik rol üstlenen bir makromoleküldür. Spesifik olarak hidroksil radikalini temizleyen bir antikosidandır(63). Hidroksil radikali çok fazla reaktiftir ve kısa ömürlü bir radikaldir. Protein, polisakkaridler, nükleik asitler ve poliansatüre yağ asitleri ile reaksiyona girer. Poliansatüre yağ asitleri hücre membranında fazla miktarda buldukları için hücre membranı bu radikal için en önemli saldırı alanını oluşturur. Bu radikalın hücre membranına saldırması, lipid peroksidasyonuna neden olarak hücre zarı parçalanması ve sonuçta hücre ölümüne neden olur(64). Hidroksil radikali, mannitol ile reaksiyona girerek mannitoldeki hidrojen atomlarından biri hidroksil radikaline aktarılarak su ve hidroksil radikaline göre çok daha az sitotoksik mannitol radikali oluşur(65).



İnsanlar üzerinde yapılan başka bir çalışmada, mannitolün iskemiyeye sekonder oluşan trombosit agregasyonunu önlediği; koroner arter by-pass yapılan hastalarda H₂O₂ yapımını azalttığı, serebral iskemide nöroprotektif etkileri ile nöronları nekroz ve apoptozisten koruduğu gösterilmiştir(66).

Sağöz ve ark. (63)'nın belirttiğine göre Magovern ve arkadaşlarının tavşanlarda yaptığı bir çalışmada; kalp kasının iskemi/reperfüzyon hasarından; mannitolün, osmolar ve özellikle hidroksil iyonu olmak üzere serbest radikal toplayıcı etkisi sayesinde kurtulduğu bulunmuştur.

Yoshida (67)'nin belirttiğine göre Peterson ve arkadaşlarının yaptığı bir klinik çalışmada ise mannitolün; iskemi/reperfüzyon hasarında Tromboksan A₂ (TXA₂) sentezini inhibe ederek nötrofillerin TXA₂ tarafından aktive edilip sitokin salgılamasını önlediğini göstermiştir.

Mannitol, iskelet kası iskemi/reperfüzyon hasarında; hiperosmolar özellikleri sayesinde post iskemik dokuda ödemi azaltır, lökositlerin mikrovasküler yatakta oluşturdukları tıkaçları temizler ve serbest radikal toplayıcı özellikleri sayesinde

serbest radikallere bağlı oluşan kas nekrozunu önler. Ayrıca bu üç özelliği nedeniyle de, kompartman basıncını da azaltmaktadır.

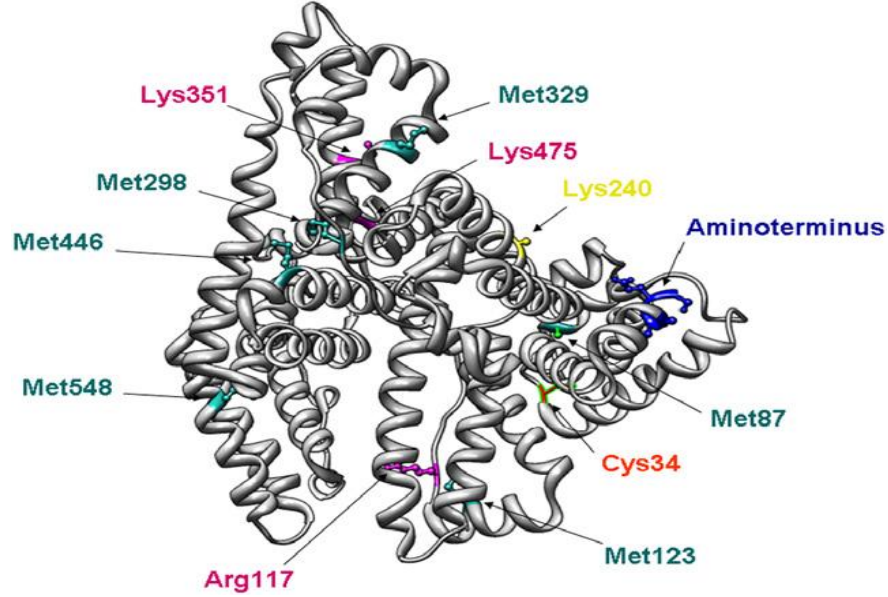
Sağöz ve ark. (63)'nin belirttiğine göre Oreddson ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada; rat overlerinde iskemi/reperfüzyon hasarı oluşturularak, ratlara mannitol, glukoz ve kristaloid solüsyonları verilmiş ve ventrikül myokardının fonksiyonları araştırılmıştır. Bu çalışmanın sonucunda mannitolün, glukoz ve kristaloid solüsyonlarına göre, serbest radikal toplayıcı etkisi ve hiperosmolar özelliği sayesinde ventrikül myokardı üzerinde iskemi/reperfüzyon hasarını azaltıcı etkisi gösterilmiştir. Bununla birlikte mannitol, overleri iskemi/reperfüzyon hasarından korumuştur(63,64).

2.13 Human Albumin

Fizyolojik koşullarda SOR'nin ana kaynağı, mitokondriyal elektron transport zincirlerinden gelen elektronlar olup, bunların kontrolünden sorumlu olan enzimatik mekanizma, süperoksid dismutaz, glutatyon peroksidaz ve katalaz gibi üç temel enzimi içerir. İnsan serum albumini, oksidatif strese maruz kalan bireyde dolaşımdaki başlıca ve en önemli antioksidandır. Albüminin total antioksidan kapasitesinin %40-80'i, yapısında bulunan tiyol gruplarını içeren metiyonin(Met) ve sisteine(Cys) bağlıdır. Met ve Cys ise, transsülfürasyon metabolik yolu aracılığı ile homosistein üzerinden birbirine bağlıdır. Birçok çalışmada, serum albümin düzeyi ile mortalite arasında ters orantı olduğu gösterilmiştir. Serum albümin konsantrasyonunda kronik olarak; her 2,5 g/dL azalmanın, mortaliteyi %24 den %56 ya kadar değişen bir aralıkta artırdığı ileri sürülmektedir . Yarılanma süresi ortalama 14,8 gün olduğundan postoperatif akut oksidatif strese bağlı akut albümin azalmasının postoperatif dönemde ilk 12 saat içinde olması beklenir(68).

Albumin, total plazma proteinlerinin %50'sini oluşturur ve plazma konsantrasyonu 0.6 mmol/l'tir. İnsan serum albumin, 66 kilodalton ağırlığında, 585 aminoasitten yapılmış küçük bir globüler proteindir. Fazla miktarda aspartik asit ve lizin rezidüleri içerirken; bir miktarda triptofan ve metiyonin rezidüleri içerir. X-ışını kristalografisinde albumin kalp benzeri üç boyutlu yapıda iken; solüsyonlarda elipsoid yapıdadır. Bu üç boyutlu yapının %67'si α -heliksten oluşmaktadır. Protein, A ve B subünitelerinden oluşan üç adet ana bölge içerir. Her subünite, esnek

kıvrımların oluşumunu sağlayan, prolin rezidülerinden oluşmuş 4 veya 6 α -heliksinden oluşmaktadır. Albumin, tersiyer yapısına katkıda bulunan, 17'si disülfid bağı ile birbirine bağlanmış toplam 25 adet sistin rezidüleride içermektedir(69,70). Şekil 2.7'de albuminin üç boyutlu yapısı ve bağlanma bölgeleri gösterilmektedir(71).

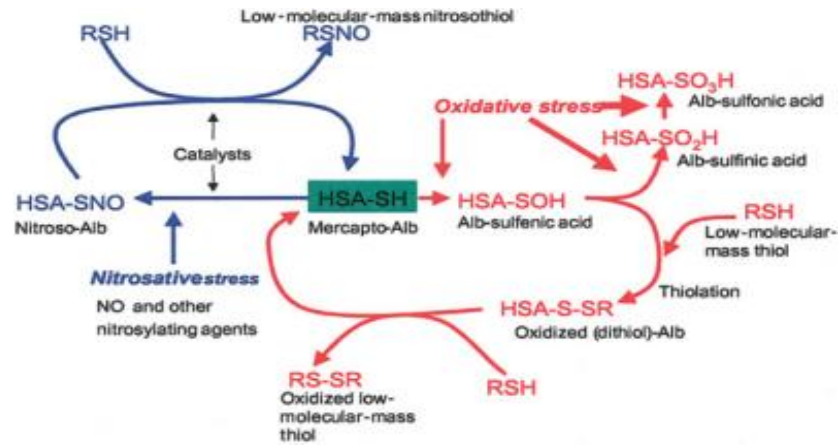


Şekil 2.6. Albuminin üçboyutlu yapısı ve bağlanma bölgeleri

İnsan serum albumini, ligand bağlama ve taşıma fonksiyonu, antioksidan özelliği ve enzimatik aktivitesi olan multifonksiyonel glikozillenmemiş, negatif yüklü, tersiyer yapıda bir polipeptit'dir. Serbest oksijen radikallerine karşı enzimatik olmayan savunmada öncelikle serum proteinleri ve bunlar arasında da en önemlisi olan serum albümini yer almaktadır. Birincil olarak karaciğerde sentezlenir ve bir akut faz proteindir. Fizyolojik olarak albumin, kolloid ozmotik basıncının sağlanmasından, mikrovasküler yatak ile ekstraseküler ortam arasındaki bütünlükten, nötrofil aktivasyonu ile inflamasyondan sorumludur. Klinik olarak albumin, en sık volüm genişletici olarak kullanılmakta ve kroik hastalarda serum albumin seviyesindeki azalma ile mortalite arasında ters orantı bulunmaktadır(69).

Albumin normal fizyoloji içindeki önemli fonksiyonlarından biri de intravasküler alandaki normal onkotik basıncın % 75'ini sağlaması ve plazma pH'sını ayarlamasıdır(72). Bu fonksiyonlarının yanında plazmanın en önemli antioksidan maddesidir. Oksidatif strese maruz kalan bireyde dolaşımdaki başlıca ve en önemli antioksidandır. Albüminde, çoğunluğu disülfid köprüleri içeren ve tersiyer

yapıya katılan 35 Cys molekülü bulunur. Sadece 34. konumdaki aminoasit olan Cys (Cys34), redoksaktif tiyol grubu içeren serbest sisteindir, bu da plazma tiyolünün %80'nini meydana getirir. Diğer bir deyişle, albümin serumdaki reaktif tiyol gruplarının ana kaynağıdır ve Cys34'ün tiyol grubu, reaktif oksijen ve nitrojen radikallerinin süpürülmesinde etkindir. Albüminin yapısında Cys gibi sülfür içeren ikinci aminoasit Met'dir. Yapılan çalışmalar, Met'in de aynen Cys gibi oksidasyona çok duyarlı olduğunu ve reaktif oksijen ve nitrojen radikalleri ile birleştiğinde sülfoksit meydana geldiğini göstermiştir Her iki sülfür içeren aminoasit, Met ve Cys, transsülfürasyon metabolik yolu aracılığı ile birbirine bağlıdır. Bu metabolik yolda, Met, homosistein üzerinden Cys'e çevrilir. Bu reaksiyon sonucunda sistein, ana hücre içi radikal süpürücüsü olan glutatyon sentezi dahil olmak üzere birçok hücrel protein sentezinde kullanılır. Met ve Cys aminoasitleri SOR'nin oksidatif etkisine son derece duyarlıdır(68). Şekil 2.8'de mavi oklar ile albuminin yapısında bulunan 34. Sisitinin aminoasidinin nitrojenlenmesi görülmektedir, kırmızı oklar ise albuminin oksitlenmesi ve tiyollenmesini şematize etmektedir(69). Yapılan çalışmalarda, albuminin plazma lipoproteinlerini bakır aracılı oksidasyondan; kan elemanlarını ise serbest radikaller tarafından hemoliz edilmekten koruduğu gösterilmiştir(70).

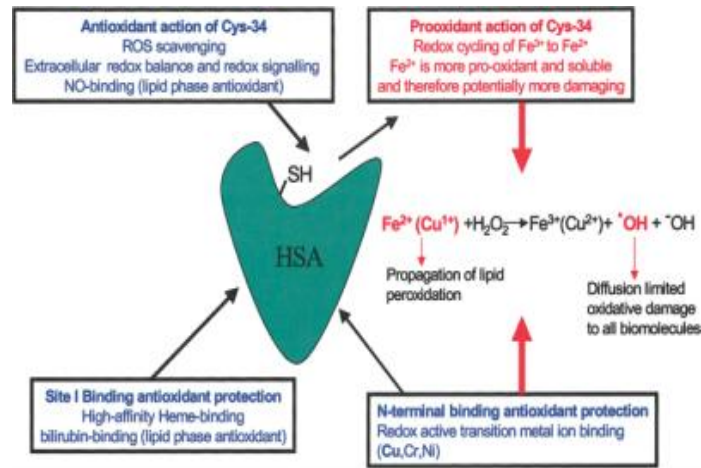


Şekil 2.7. Albuminin yapısında bulunan 34. Sisitinin aminoasidinin nitrojenlenmesi ve albuminin oksitlenmesi ve tiyollenmesi

İnsan serum albumin, ilaçlar, yağ asitleri, Cu^{++} ve Zn^{++} gibi metaller, amino asitler, serbest radikaller başta olmak üzere birçok endojen ve eksojen maddelere

bağlanarak onları taşımakta, nötralize etmekte ve antioksidan savunmayı sağlamaktadır(69,70).

Albumin, nötrofil kaynaklı olan hidrojen peroksit, süperoksit ve hipoklorikasit gibi serbest oksijen radikallerini toplayarak oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunur. Ayrıca karaciğer ve böbrek yetmezliğine neden olan karbontetraklorid ve üremik toksinleri kendine bağlayarak antioksidan özellik gösterir(69,70,73). Şekil2.9’da insan albuminin antioksidan (mavi renkli) ve pro-oksidan (kırmızı renkli) özelliklerini şematize etmektedir. Albumin, demir ve bakır iyonlarını 34. Sisitin terminaline bağlayarak bunların katalize ettiği fenton reaksiyonunu dolayısıyla hidroksil radikali oluşumunu önlemektedir(69).



Şekil2.8. İnsan albuminin antioksidan ve pro-oksidan özellikleri

Yapılan bir çalışmada, glukoz solüsyonlarında bekletildikten sonra vücuda verilen albuminin antioksidan özelliğinin kaybolduğu tespit edilmiştir(74).

2.14 Euro Collins Solüsyonu

1969 yılında Collins ve arkadaşları; solid organ transplantasyonunda organın donörden alınarak alıcıya nakledilene kadar uygun koşullarda saklanmasını sağlayan bir solüsyon tariflemişlerdir. Daha sonraki dönemlerde ise Belzer ve arkadaşları; solid organın nakil öncesi bekleme süresini uzatan ve organın daha iyi saklanmasını sağlayan Collins Solüsyonu'nun modifikasyonu olan Euro Collins Solüsyonu'nu bulmuşlardır(75). Euro Collins Solüsyonu; yüksek oranda glukoz içeren fosfatla

tamponlanmış sakkarid solüsyonudur(75). Organ transplantasyonlarında iskemik dönemdeki organın muhafazası için kullanılmakta olup iskemi zamanının uzatılmasını sağlamaktadır. Tablo 2.10'da Euro Collins Solüsyonunun elektrolit değerleri gösterilmektedir(76).

Tablo 2.10. Euro-Collins Solüsyonunun elektrolit değerleri

Sodyum 9.3 mmol/l
Potasyum 115.1 mmol/l
Magnezyum 4.7 mmol/l
Kalsiyum - -
Klor 15 mmol/l
Fosfat 57.6 mmol/l
Sulfat 4.7 mmol/l+
Glukoz 190 gr/l
Mannitol 32 gr/l

Akciğer transplantasyonunda, yüksek potasyum konsantrasyonları nedeniyle EC, pulmoner vazokonstriksiyonu takiben pulmoner ödem oluşumuna neden olmaktadır(77). Pulmoner ödemin diğer bir nedenide; pulmoner vasküler endotel hasarına sekonder oluşan inflamasyondur. İnflamasyon ile ortama gelen nötrofil ve bazofillerin degranulasyonu sonucu kalın olan alveolar septa incelmekte buda akciğer ödemi ile sonuçlanmaktadır(78).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Kurulu'nun 08.12.2010 tarih 178 kayıt numaralı onayı sonrasında çalışma yapıldı. Deneyle hayvanları Tıbbi ve Cerrahi Deneysel Araştırma Merkezi'nden (TİCAM) temin edildi. Ortalama ağırlıkları 250-300gr. olan 56 adet Sprague-Dawley cinsi dişi sıçan randomize olarak eşit sayıda (n = 7) 8 gruba ayrıldı. Sıçanlar deneyle süresince 12'şer saatlik aydınlık-karanlık ışıklandırması olan, ısısı 20-22 C° ve nemi %45-%50 otomatik olarak ayarlanan odalarda yaşatıldı. Bu süreçte tüm sıçanlar şeffaf kafeslerde tutuldu, standart sıçan yemi ile beslendi ve çeşme suyu verildi.

3.1. Deneklerin Hazırlanması ve Operasyon Tekniğı

Deneylede kullanılacak tüm ratlar, ketamin hidroklorid (50mg/kg) (Ketalar® 50mg/ml flakon, Pfizer) ve xylasine (12mg/kg) karışımının intraperitoneal yolla verilmesiyle genel anesteziye alındı. Deneyle hayvanları, anestezi ajanlarının uygulanmasının ardından ameliyat masasına prone pozisyonunda yatırıldı. Sağ alt ekstremitede iskemisi için, sağ inguinal katlantının üzerinden yapılan cilt insizyonunun ardından cilt altı yumuşak dokular geçildikten sonra femoral arter/ven paketi bulunarak; femoral arterin eksternal iliak arterden ayrılma noktasından, mikrovasküler klemler vasıtasıyla oklüzyonu sağlanarak, sağ alt ekstremitede 4 saatlik iskemiyeye bırakıldı. 4 saatlik iskeminin ardından femoral arter ve 39 gauge insülin enjektörü ile kanülize edilerek Human Albumin, %25'lik mannitol ve Euro Collins solüsyonları ile perfüzyon yapıldı. Perfüzyon esnasında, femoral vene mikrovasküler klemp konularak verilen solüsyonun alt ekstremitede oluşan strese sekonder açılmış olan şantlar vasıtasıyla distale ulaşmadan sistemik dolaşıma geçişi engellendi. Perfüzyon işlemini; klinik uygulamayı taklit etmek için, herhangi bir mikropump kullanılmadan, çalışmayı yapan cerrah tarafından manuel olarak, enjektör vasıtasıyla uygulandı. Perfüzyon işlemini 30 saniye ile 1 dakika arası zaman diliminde gerçekleştirildi. Perfüzyon işleminin ardından damar duvarındaki kanülizasyon deliğı 10/0 naylon ile mikrocerrahi yöntemleriyle onarıldı. Bu çalışmada, kullanılan reperfüzyon solüsyonlarının iskemik ekstremitede arterinden verilmesi yoluyla, ajanın sistemik dolaşıma geçip kanda seyreltilmeden, direkt hasar bölgesine uygulanması ve sonra sistemik dolaşıma katılması hedeflenmiştir.

3.2. Deney Grupları

Çalışmada öncelikle sadece anestezi verilmiş bir rattan normal akciğer ve iskelet kas dokularının örneklenmesi amacıyla, akciğer ve soleus kas biyopsileri alındı. Ardından ratlar, reperfüzyon süresinin hemen ardından örnekleme yapıldığı birinci grup ve bir hafta sonra örnekleme yapıldığı ikinci grup olarak iki ana gruba ayrıldı. Ana gruplar kendi aralarında dörder alt gruplara (n=7) ayrıldı. Birinci ana grup (n=28); herhangi bir perfüzyon solüsyonunun verilmediği birinci kontrol grubu K₁, 3mg/kg dozda %25'lik mannitol solüsyonunun verildiği birinci mannitol grubu M₁, 0.5 cc human albumin solüsyonunun verildiği birinci human albumin grubu HA₁ ve 0.5 cc Euro Collins Solüsyonu'nun verildiği birinci Euro Collins grubu EC₁ olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. Birinci ana gruptaki tüm ratlar cerrahi işlemin ardından servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edilerek histolojik inceleme için sağ soleus kas biyopsileri ve akciğer biyopsileri alınıp ayrı ayrı, %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde fiske edildi. İkinci ana grup (n=28); herhangi bir perfüzyon solüsyonunun verilmediği ikinci kontrol grubu K₂, 3mg/kg dozda %25'lik mannitol solüsyonunun verildiği ikinci mannitol grubu M₂, 0.5 cc human albumin solüsyonunun verildiği ikinci human albumin grubu HA₂ ve 0.5 cc Euro Collins Solüsyonu'nun verildiği ikinci Euro Collins grubu EC₂ olmak üzere 4 alt gruba ayrıldı. İkinci gruptaki tüm ratlar cerrahi işlemin ardından açılan insizyonlar 4/0 prolene ile kapatılarak uzun dönem etkinin araştırılması amacıyla bir hafta yaşatıldı. Bir hafta sonunda ratlar sakrifiye edilerek akciğer biyopsileri ve sağ soleus kas biyopsileri alındı ve ayrı ayrı %10'luk tamponlu nötral formaldehit çözeltisinde fikse edildi.

3.3. Histolojik Teknikler

Çalışmada alınan tüm biyopsiler, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı'na histolojik incelemenin yapılması amacıyla teslim edildi. Histoloji ve Embriyoloji Anabilim Dalı laboratuvarlarında, alınan akciğer ve kas dokusu örneklerinin % 10'luk formalin fiksasyonu içinde 48 saat süre ile fiksasyonları sağlandı. Fiksasyonları sağlanan örnekler fiksatifin çökmesini engellemek amacıyla 3-4 saat çeşme suyunda yıkandı. Çeşme suyuyla yıkanan doku parçaları daha sonra sırasıyla kademeli olarak %70'lik, %80'lik, %90'lık ve %96'lık

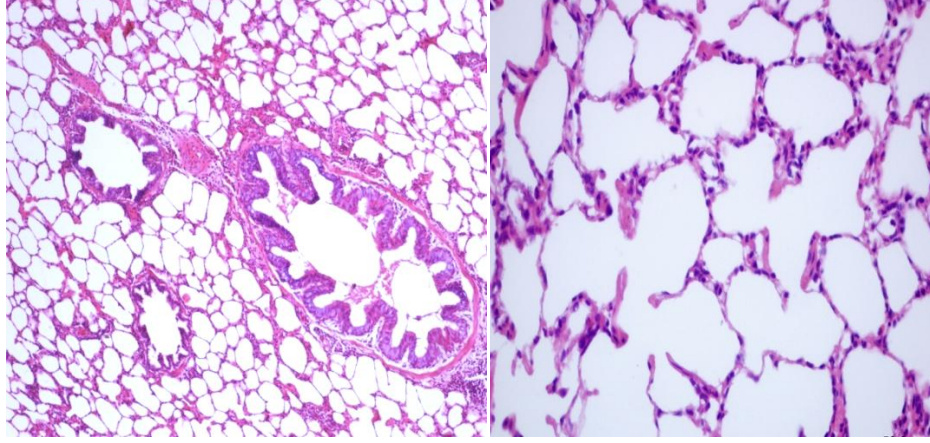
alkol serilerinde 45'er dakika bekletilerek dehidratasyonları sağlandı. Dehidratasyonlarının ardından örnekler şeffaflandırılmak üzere 2 kez 20'er dakika ksilolde bekletildi. Akciğer ve kas dokusu örnekleri şeffaflanmalarının ardından etüv içinde 65°C'de eritilmiş parafinlere alınarak 60 dakika süreyle üç ayrı parafinde bekletildi. Parafinize edilen dokular ayrı ayrı parafin içeren kasetlere gömülerek bloklandı ve kesit alınmaya hazır duruma getirildi. Parafin bloklardan kesitlerin alınmasında kullanılacak mikrotom bıçağı buzdolabında soğutulularak, mikrotom aracılığı ile her bir örnekten 5'er mikrometre kalınlığında doku kesitleri alındı. Kesitlerin 45°C'de su banyosunda açılmaları sağlanarak temiz lamalar üzerine alınmasından sonra etüv içinde 1 saat süre ile bekletilmeleri sağlandı. Preparatlar 1'er saat süre ile iki ayrı ksilolde tutulup deparafinizasyonları sağlandıktan sonra boyama aşamasına geçildi. Kesitlerin boyanmasında Hematoksilin-Eosin ikili boyası kullanıldı. Deparafinizasyonu yapılmış olan doku kesitleri 5'er dakika süreyle %96, %90, %80, %70'lik alkollerde ve distile suda bekletildi. Kesitler Hematoksilin ile 2 dakika ve Eosin ile 10 dakika boyandı. Çeşme suyu ile fazla boyası alınan kesitler hızla alkol serilerinden geçirilip dehidratasyonları sağlandı. Dokular iki ayrı ksilolde 30'er dakika tutularak şeffaflandırıldı ve şeffaflanan dokuların daha sonra entellan ile kapatıldı. Hazırlanan tüm preparatların ışık mikroskopik düzeyde Olympus BH-2 mikroskop ile aynı histolog tarafından değerlendirilmeleri yapıldı akciğer ve kas dokusu örneklerini içeren tüm preparatların Olympus DP-70 digital kamera ile fotoğrafları çekildi.

3.4. İstatistiksel Analiz Yöntemleri

Tüm veri analizleri SPSS 15.0 ve SigmaStat 3.5 paket programları ile yapılmıştır.. Bağımsız ölçümlerden oluşan ve normal dağılım gösteren sürekli veriler Mann-Whitney U testi ile analiz edilmiştir. $p > 0.05$ olasılık değerleri 'fark yok', $p < 0.05$ olasılık değerleri 'önemli düzeyde farklılık var', $p < 0.01$ olasılık değerleri 'çok önemli düzeyde farklılık var', $p < 0.001$ olasılık değerleri 'ileri düzeyde farklılık var' olarak kabuledilmiştir.

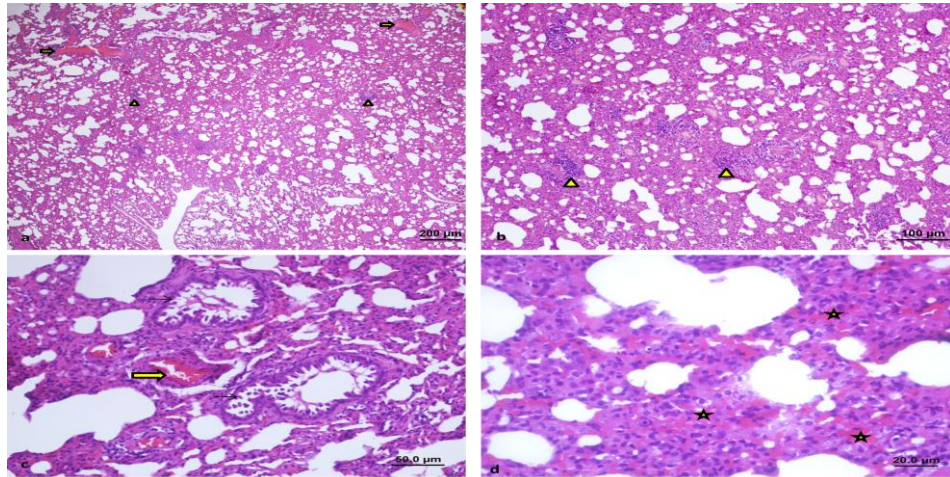
4. BULGULAR

4.1. Akciğer Işık Mikroskopik Değerlendirmeleri



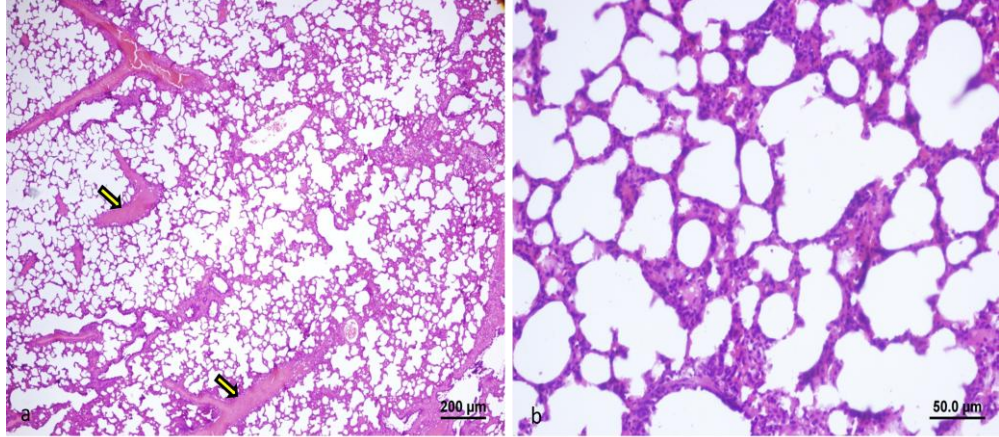
Şekil 4.1 Normal akciğer dokusunda respiratuar bronşiyol ve alveolar keseler görülmektedir.

K_1 grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde periarteriyal hücresel infiltrasyon, alveolar duvar kalınlaşması, vasküler kongesyon, bronşiyol epitel hücrelerinde yoğun dejenerasyon ve dökülmeler ile interalveolar hemoraji görüldü (Şekil 4.2).



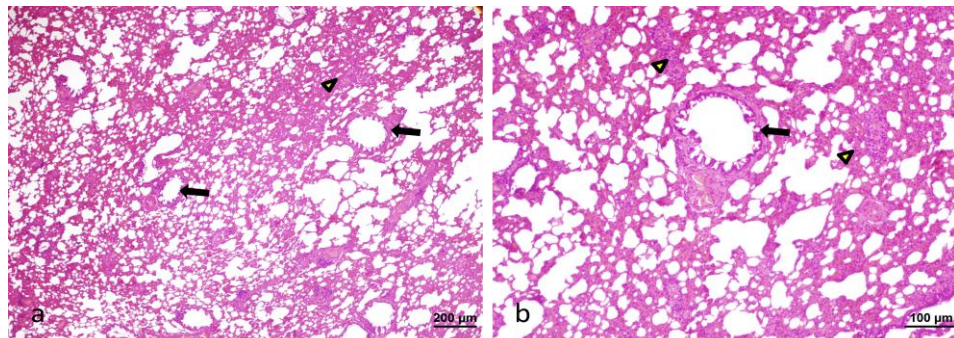
Şekil 4.2 K_1 grubu akciğer örnekleme. Periarteriyal hücresel infiltrasyon (ok başı), alveolar duvar kalınlaşması (a,b), vasküler kongesyon (ok) (a,c), bronşiyol epitel hücrelerinde yoğun dejenerasyon ve dökülmeler (ince ok) (c) ve interalveolar hemoraji (*) (d) (HE, X4,10,20,40).

M₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde normale yakın akciğer örneği görüldü. Bununla birlikte, bu gruptaki akciğerlerde interalveolar vasküler konjesyon dikkat çekiciydi (Şekil 4.3).



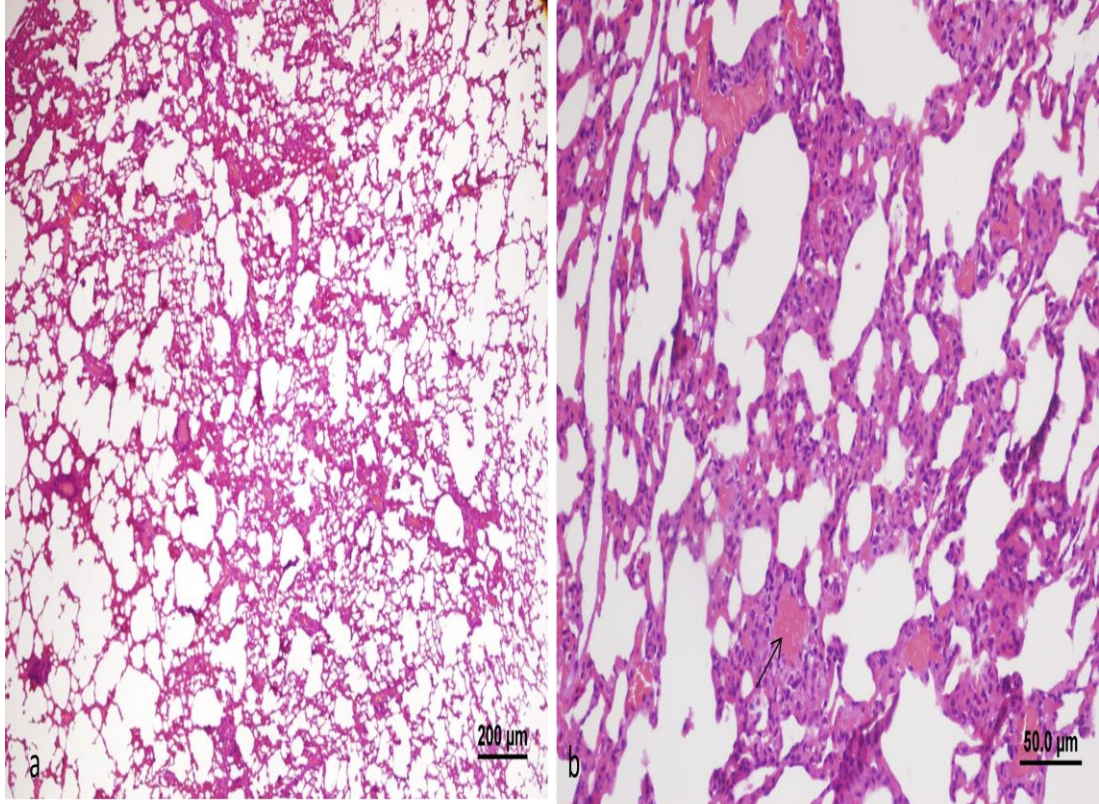
Şekil 4.3 M₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi. İnteralveolar vasküler konjesyon görülmektedir (ok) (a,b), (HE, X4 ,20).

HA₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normal akciğer alveolar yapısı ve bronşiol yapısı görüldü. Aynı grupta bazı alanlarda kısmi interalveolar hücre infiltrasyonu da gözlemlendi (Şekil 4.4)



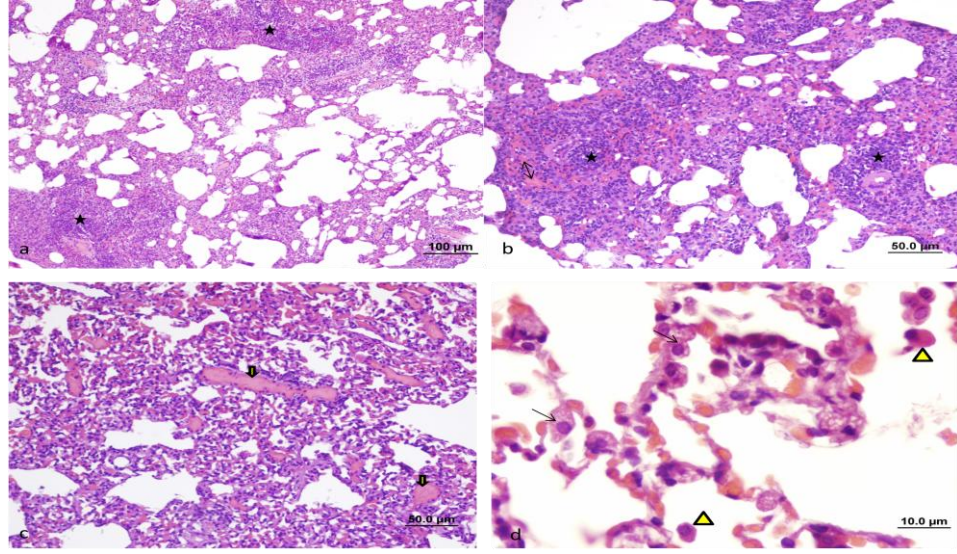
Şekil 4.4 HA₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi. İnteralveolar hücre infiltrasyonu görülmektedir (ok) (a,b) (HE, X4, 10).

EC₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normale yakın akciğer örneği görüldü. Ancak bu gruptaki akciğerlerde kısmi interalveolar vasküler konjesyon da dikkat çekti (Şekil 4.5).



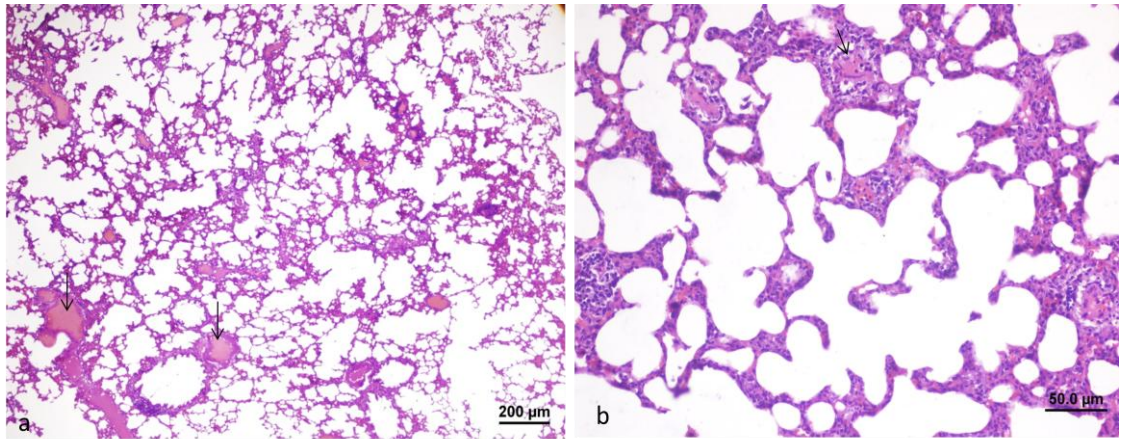
Şekil 4.5 EC₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi. Kısmi interalveolar vasküler konjesyon (ok) (a,b) (HE, X4, 20).

K₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, alveolar duvar kalınlaşmaları, interalveolar alanlarda hücresel infiltrasyon ve hemoraji ile vasküler konjesyon gözlemlendi. Ayrıca immersiyon objektifte değerlendirilen preparatlarda immersiyon objektifte alveolar makrofajların sayıca arttığı gözlemlendi (Şekil 4.6).



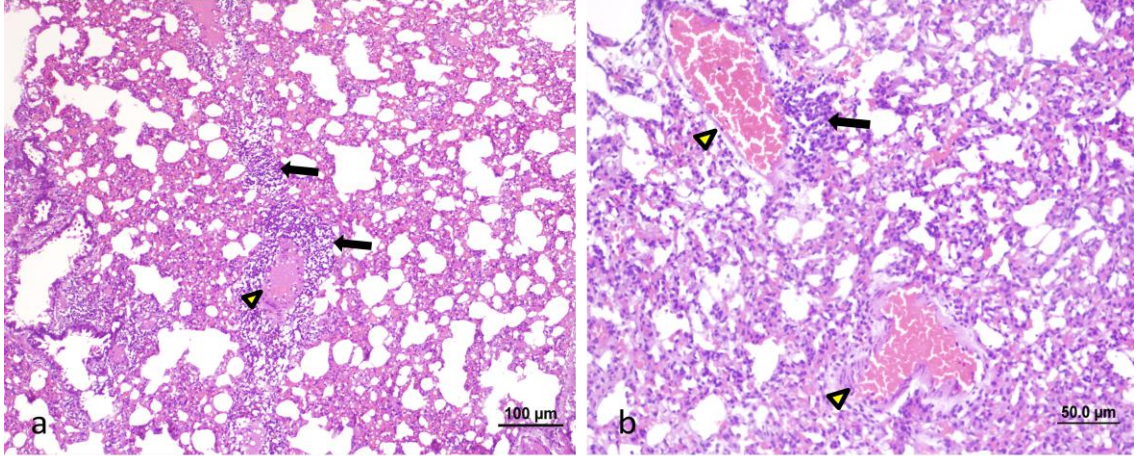
Şekil 4.6 K₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi. Alveolar duvar kalınlaşmaları, interalveolar alanlarda hücresel infiltrasyon (*) (a,b), interalveolar hemoraji (çift yönlü ok) (b), vasküler konjesyon (ok) (c). Alveolar makrofajlar (ok başı) ve alveol duvarında tip 2 pnömositler (ince ok) (d) görülmektedir (HE, X10,20,100).

M₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normal akciğer alveolar yapıları görüldü ancak bu grupta bazı alanlarda kısmi vasküler konjesyona da rastlandı (Şekil4.7) .



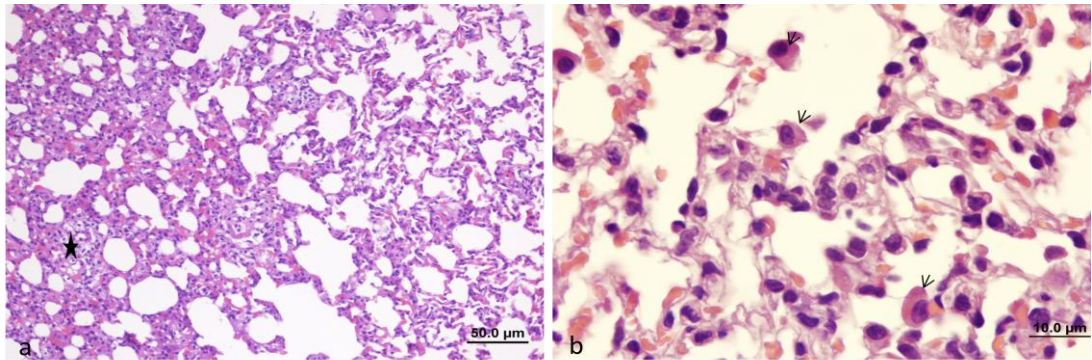
Şekil 4.7 M₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesi. Normal akciğer alveolar yapıları, kısmi vasküler konjesyon (ok) (a,b) (HE, X4, 20).

HA₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, vasküler konjesyon ve periarteriyal hücre infiltrasyonu görüldü (Şekil 4.8).



Şekil 4.8 HA₂ grubu akciğer doku örnekleme. Vasküler konjesyon (ok başı) ve periarteriyal hücre infiltrasyonu (ok) (a,b) (HE, X10, 20).

EC₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan akciğer örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normale yakın akciğer alveolar yapısı gözlemlendi. Bazı alanlarda alveolar duvar kalınlaşmaları dikkat çekti. Büyük büyültmede değerlendirilen preparatlarda immersiyon objektifte alveolar makrofajların sayıca arttığı gözlemlendi (Şekil 4.9).

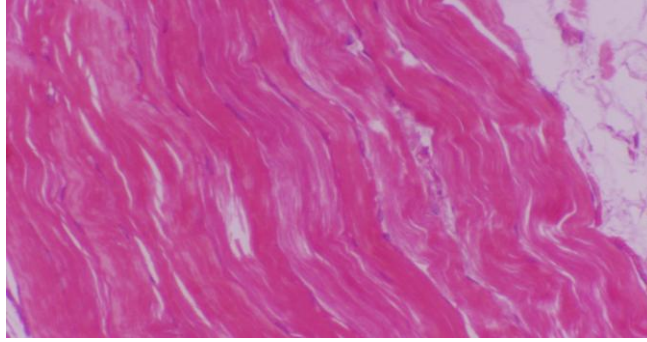


Şekil 4.9 EC₂ grubu akciğer doku örnekleme. Alveolar duvar kalınlaşmaları (*) (a), alveolar makrofajlar (ok) (b) (HE, 20,100).

Tablo4.1 akciğer dokularındaki hasar skorlanmıştır. Skorlamada 0: hasar yok, 1: az hasar 2: orta hasar 3: çok hasar (ADK: alveolar duvar kalınlaşması VK: vasküler konjesyon İAH: intrer alveolar hemoraji Hİ: hücrel infiltrasyon AMA: alveolar makrofaj artışı)

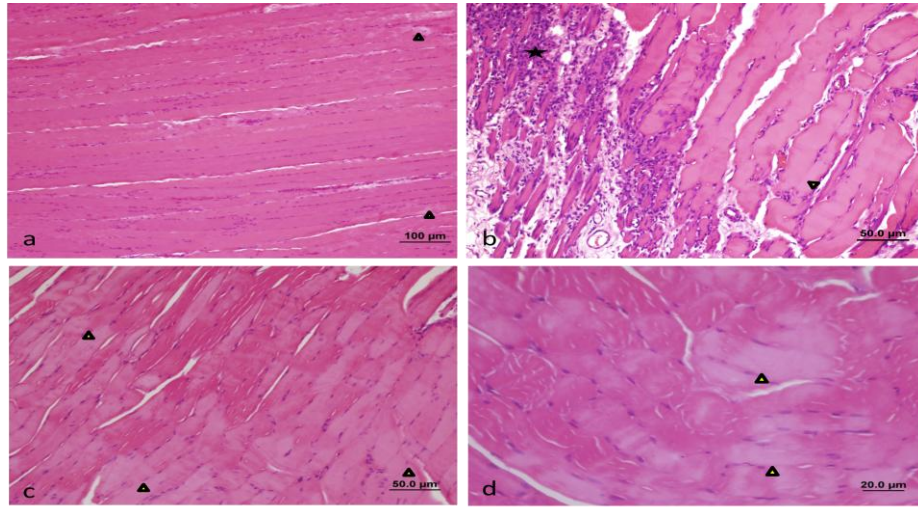
AC ₁	ADK	VK	İAH	Hİ	AMA	AC ₂	ADK	VK	İAH	Hİ	AMA
K ₁ - 1	2	2	2	3	3	K ₂ - 1	3	3	3	3	3
K ₁ - 2	3	2	2	3	3	K ₂ - 2	3	2	2	3	1
K ₁ - 3	2	3	3	2	2	K ₂ - 3	2	3	3	3	1
K ₁ - 4	2	3	2	2	2	K ₂ - 4	3	3	2	3	3
K ₁ - 5	3	2	2	3	3	K ₂ - 5	3	2	3	3	2
K ₁ - 6	3	3	2	2	2	K ₂ - 6	2	3	1	3	2
K ₁ - 7	2	2	2	3	2	K ₂ - 7	2	3	3	3	3
M ₁ -1	0	1	0	0	0	M ₂ -1	0	1	0	0	0
M ₁ -2	0	2	0	0	0	M ₂ -2	0	1	0	0	0
M ₁ -3	0	1	0	1	0	M ₂ -3	0	1	0	1	0
M ₁ -4	0	2	0	0	0	M ₂ -4	0	0	0	0	0
M ₁ -5	0	2	0	0	0	M ₂ -5	0	0	0	0	0
M ₁ -6	0	2	0	0	0	M ₂ -6	0	0	0	1	0
M ₁ -7	0	1	0	1	0	M ₂ -7	0	1	0	0	0
EC ₁ -1	1	1	0	0	0	EC ₂ -1	1	0	0	0	2
EC ₁ - 2	0	0	0	0	0	EC ₂ - 2	0	0	0	0	1
EC ₁ - 3	1	2	0	0	0	EC ₂ - 3	1	0	0	0	1
EC ₁ - 4	1	0	0	0	0	EC ₂ - 4	1	0	0	0	0
EC ₁ - 5	1	1	0	0	0	EC ₂ - 5	1	0	0	0	1
EC ₁ - 6	1	0	0	0	0	EC ₂ - 6	1	0	0	0	0
EC ₁ - 7	0	0	0	0	0	EC ₂ - 7	1	0	0	0	1
HA ₁ - 1	1	0	0	1	0	HA ₂ - 1	2	2	1	2	0
HA ₁ - 2	1	0	0	2	0	HA ₂ - 2	1	1	1	1	0
HA ₁ - 3	0	0	0	2	0	HA ₂ - 3	1	1	0	1	0
HA ₁ - 4	1	0	0	1	0	HA ₂ - 4	1	0	0	0	0
HA ₁ - 5	0	0	0	1	0	HA ₂ - 5	1	1	0	0	0
HA ₁ - 6	1	0	0	1	0	HA ₂ - 6	1	0	1	0	0
HA ₁ - 7	0	0	0	1	0	HA ₂ - 7	0	2	1	1	0

4.2. Soleus Kası Işık Mikroskopik Değerlendirmeleri



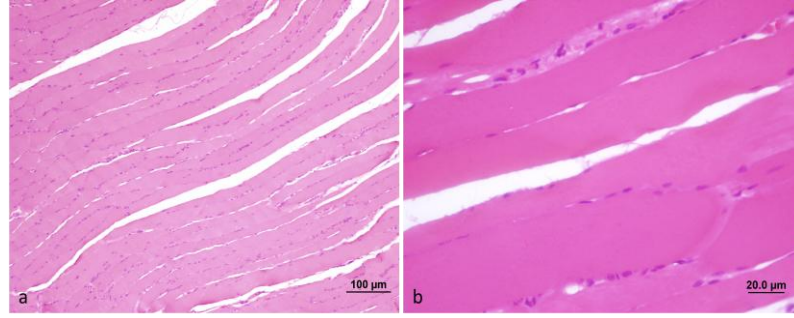
Şekil 4.10 Normal soleus kası ışık mikroskopik görünümü. İğsi iskelet kası hücreleri ile periferik yerleşimli oval nukleuslar(HE, X20).

K₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, nekrotik kas fibrilleri, yoğun hücreyel infiltrasyon ve ödem görüldü (Şekil 4.11).



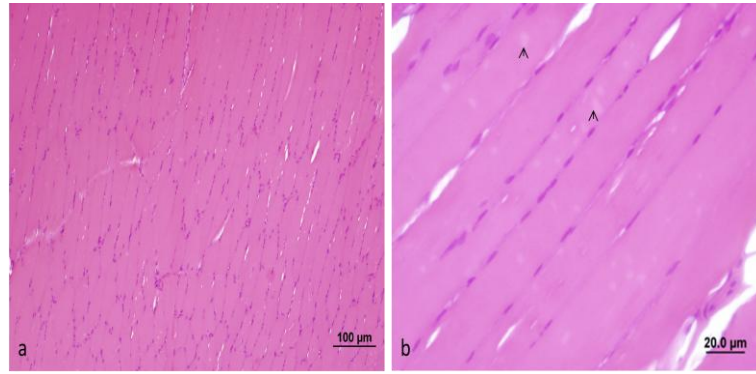
Şekil 4.11 K₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri. nekrotik kas fibrilleri (ok başı) (a,b,c,d) ve kas fibrilleri arasındaki yoğun hücreyel infiltrasyon (*) ve ödem (b) (HE, X10,20,40).

Mannitol grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde kas dokusu normal yapıda görüldü (Şekil 4.12).



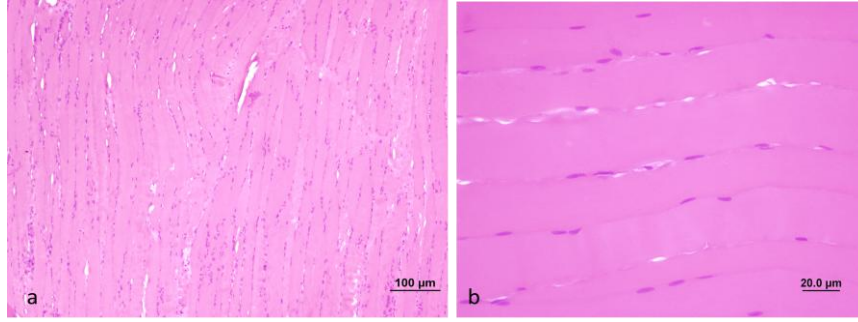
Şekil 4.12 M₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri. Normal görünümlü kas dokusu ve kas fibrilleri (a,b), (HE, X10 ,40).

EC₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normale yakın kas dokusu görüldü. Ancak bazı kas fibrillerinde fokal nekrotik alanlar dikkat çekti (Şekil 4.13).



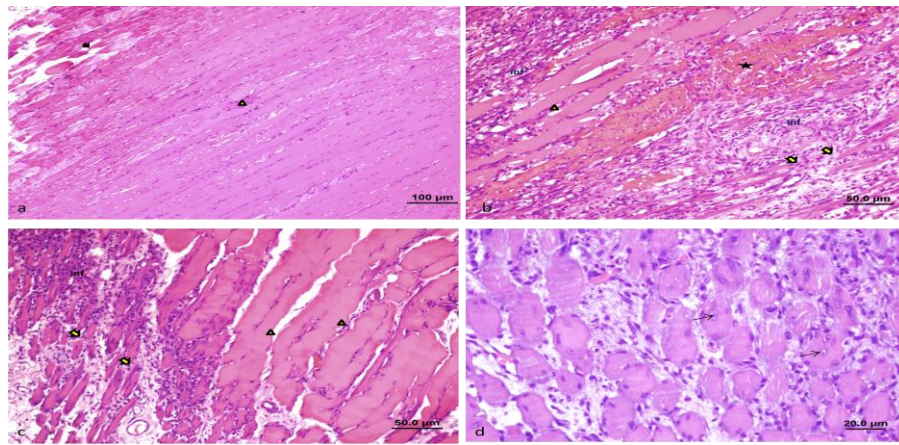
Şekil 4.13 EC₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri. Kas fibrillerinde fokal nekrotik alanlar (ok) (a,b) (HE, X10, 40).

HA₁ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde normale yakın kas dokusu yapısı gözlemlendi (Şekil 4.14).



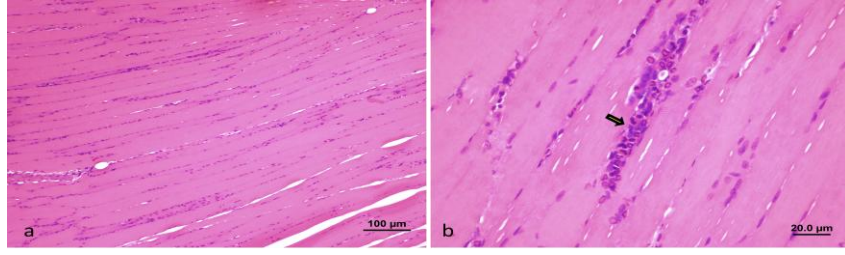
Şekil 4.14 HA₁ grubu soleus kas dokusu örnekleri. normal kas yapısı, perifeal yerleşimli oval nukleuslar görülmekte. (a,b) (HE, X10, 40).

K₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde kas fibrillerinde disorganizasyon, nekrotik kas fibrilleri, hücrel infiltrasyon, kas fibrilleri arasında hemoraji gözlemlendi. Ayrıca özellikle merkezi yerleşimli çekirdekleriyle rejenerasyon gösteren kas fibrilleri dikkat çekti (Şekil 4.15).



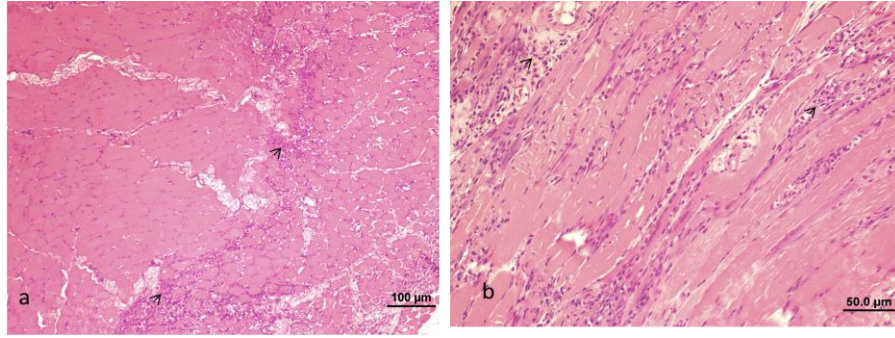
Şekil 4.15 K₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri. Kas fibrillerinde disorganizasyon (ok) (a,b,c), nekrotik kas fibrilleri (ok başı), hücrel infiltrasyon (inf) (b,c), hemoraji (*) (c) ve merkezi yerleşimli çekirdekleriyle rejenerasyon gösteren kas fibrilleri (ince ok) (d) (HE, X10,20,40).

M₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normale yakın görümlü kas dokusu gözlenmekle birlikte bazı bölgelerde kas fibrilleri arasında kısmi hücrel infiltrasyon görüldü (Şekil 4.16).



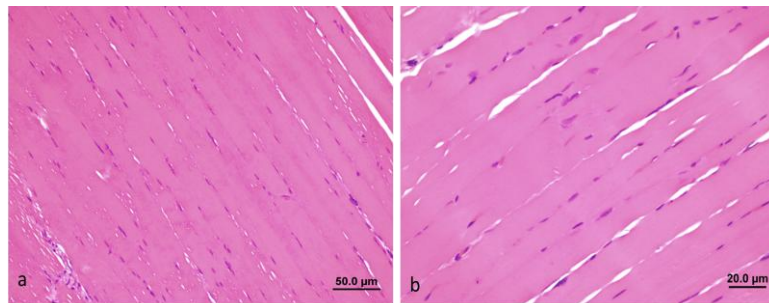
Şekil 4.16 M₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri. Kas fibrilleri arasında kısmi hücresel infiltrasyon (ok) (HE, X10,40).

EC₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde, normale yakın görünümlü kas fibrilleri gözlemlendi ancak bazı kas fibrilleri arasında kısmi hücresel infiltrasyon görüldü (Şekil 4.17)



Şekil 4.17 EC₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri. Kas lifleri arasında kısmi hücresel infiltrasyon (ok) görülmektedir (HE, X10,20).

HA₂ grubuna ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde kas dokusu normal yapıda görüldü (Şekil 4.18).



Şekil 4.18 HA₂ grubu soleus kas dokusu örnekleri. Normal görünümlü kas dokusu görülmektedir. (HE, X20,40).

Tablo4.2 Soleus kas dokusundaki hasar skorlaması Skorlamada 0: hasar yok, 1: az hasar 2: orta hasar 3: çok hasa HN: hücrel nekroz KND: kas fibrillerinde disorganizasyon Hİ: hücrel infiltrasyon HEM: hemoraji KÖ: Kas ödemi

KAS ₁	HN	KFD	Hİ	HEM	ÖD	KAS ₂	HN	KFD	Hİ	HEM	KÖ
K ₁ -1	3	3	3	1	3	K ₂ -1	3	3	3	3	3
K ₁ -2	3	2	2	1	2	K ₂ -2	3	3	2	3	1
K ₁ -3	2	3	3	0	3	K ₂ -3	2	3	3	3	1
K ₁ -4	2	2	3	0	3	K ₂ -4	3	3	2	3	3
K ₁ -5	3	2	3	1	3	K ₂ -5	3	3	3	3	2
K ₁ -6	2	3	3	0	2	K ₂ -6	2	3	1	3	2
K ₁ -7	3	3	2	0	3	K ₂ -7	2	2	3	3	3
M ₁ -1	0	1	0	0	0	M ₂ -1	0	0	1	0	0
M ₁ -2	0	0	0	0	0	M ₂ -2	0	0	1	0	0
M ₁ -3	0	0	0	1	0	M ₂ -3	0	0	1	1	0
M ₁ -4	0	0	0	0	0	M ₂ -4	0	0	0	0	0
M ₁ -5	0	0	0	0	0	M ₂ -5	0	0	1	0	0
M ₁ -6	0	0	0	0	0	M ₂ -6	0	0	1	0	0
M ₁ -7	0	0	0	1	0	M ₂ -7	0	1	0	0	0
EC ₁ -1	1	0	0	0	0	EC ₂ -1	1	0	1	0	0
EC ₁ -2	1	0	0	0	0	EC ₂ -2	0	0	1	0	1
EC ₁ -3	1	0	0	0	0	EC ₂ -3	0	0	1	0	1
EC ₁ -4	0	0	0	0	0	EC ₂ -4	0	0	1	0	0
EC ₁ -5	1	0	0	0	0	EC ₂ -5	0	0	0	0	0
EC ₁ -6	1	0	0	0	0	EC ₂ -6	0	0	1	0	0
EC ₁ -7	1	0	0	0	0	EC ₂ -7	0	0	1	0	0
HA ₁ -1	0	0	0	1	0	HA ₂ -1	0	0	1	0	0
HA ₁ -2	0	0	0	0	0	HA ₂ -2	0	0	0	0	0
HA ₁ -3	0	0	0	0	0	HA ₂ -3	0	0	0	0	0
HA ₁ -4	1	0	0	1	0	HA ₂ -4	0	0	0	0	0
HA ₁ -5	0	0	0	1	0	HA ₂ -5	0	0	0	0	0
HA ₁ -6	0	0	0	0	0	HA ₂ -6	0	0	1	0	0
HA ₁ -7	1	0	0	0	0	HA ₂ -7	0	0	0	0	0

4.3. İstatistiksel Analiz

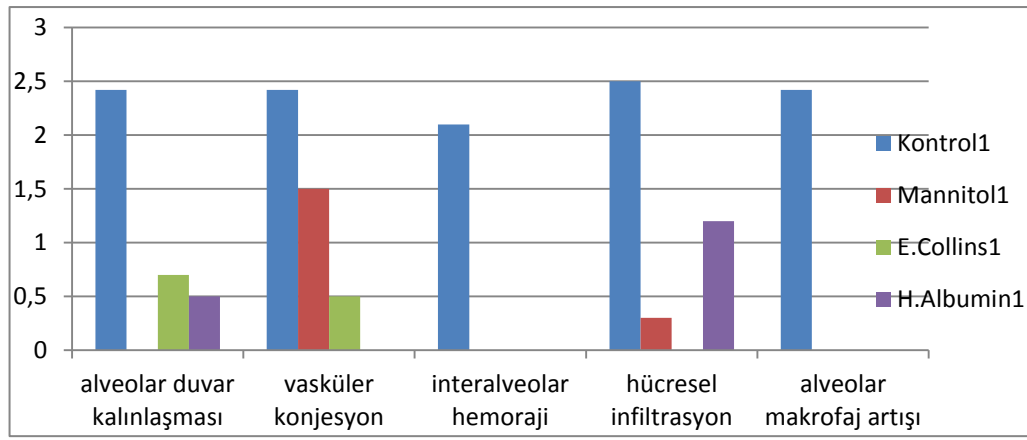
İstatistiksel analiz, Eskişehir Osmangazi Üniversitesi Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda yapıldı. Deney gruplarında histolojik incelemede, akciğerde alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, intra alveolar hemoraji, hücrel infiltrasyon, alveolar makrofaj artışı; kasta ise hücrel nekroz, kas fibrillerinde disorganizasyon, hücrel infiltrasyon, hemoraji ve ödem histolojik özelliklerine göre skorlandı. Bu skorlar kullanılarak Mann-Whitney U Testi kullanılarak istatistiksel analiz yapıldı. Test sonucunda $p>0.05$ değeri istatistiksel olarak gruplar arasında istatistiksel olarak fark olmadığını, $p<0.05$ değeri gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğunu, $p<0.01$ değeri gruplar arasında istatistiksel olarak farklılık olduğunu, $p<0.001$ değeri gruplar arasında ileri düzeyde farklılık olduğu şeklinde yorumlandı..

Akciğer biyopsilerinde, K_1 grubu ile M_1 , EC_1 ve HA_1 grupları alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, hücrel infiltrasyon ve alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırıldığında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$). Gruplar interalveolar hemoraji açısından karşılaştırıldığında ileri düzeyde farklılık saptandı ($p<0.001$). M_1 ve EC_1 grupları karşılaştırıldığında alveolar duvar kalınlaşması açısından çok önemli düzeyde farklılık ($p<0.01$), vasküler konjesyon açısından önemli düzeyde farklılık bulunurken; interalveolar hemoraji, hücrel infiltrasyon ve alveolar makrofaj artışı açısından fark saptanmadı ($p>0.05$). M_1 grubu ile HA_1 grubu, alveolar duvar kalınlaşması açısından karşılaştırıldığında önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$), vasküler konjesyon ile hücrel infiltrasyon açısından karşılaştıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$), interalveolar hemoraji ile alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırıldıklarında ise fark saptanmadı ($p>0.05$). EC_1 ve HA_1 grupları kendi aralarında alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, interalveolar hemoraji ve alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanmazken ($p>0.05$), hücrel infiltrasyon açısından karşılaştırıldıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$). Birinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel olarak karşılaştırmaları tablo 5.1.'de ve şekil 5.1.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.1 Birinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları

	ADK	VK	İAH	Hİ	AMA
K₁-M₁	p<0.01	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.01
K₁-EC₁	p<0.01	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.01
K₁-HA₁	p<0.01	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.01
M₁-EC₁	p<0.01	p<0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
M₁-HA₁	p<0.05	p<0.01	p>0.05	p<0.01	p>0.05
EC₁-HA₁	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p<0.01	p>0.05

**p>0.05 fark yok p<0.05 önemli düzeyde farklılık var, p<0.01 çok önemli düzeyde farklılık var, p<0.001 değeri ‘ileri düzeyde farklılık var



Şekil 5.1 Birinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırılmaları

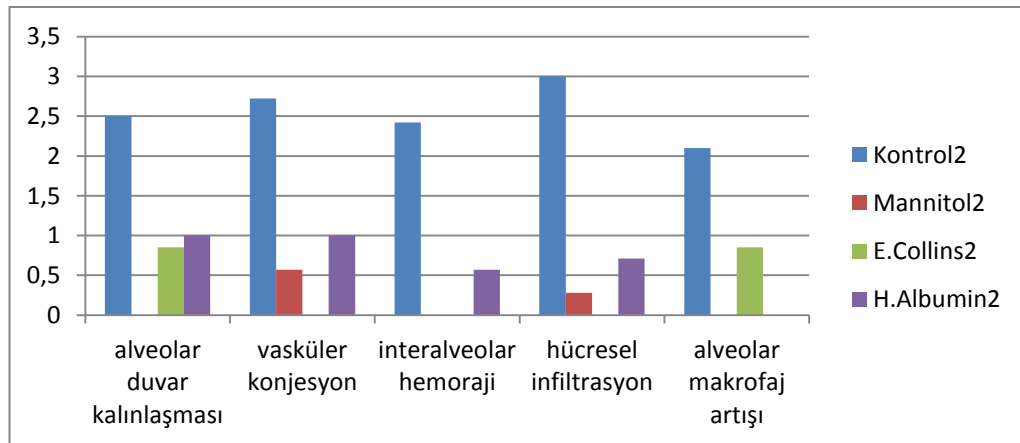
Akciğer biyopsilerinde, K₂ grubu ile M₂ grubu alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, interalveolar hemoraji, hücreyel infiltrasyon ve alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırıldığında tüm parametrelerde çok önemli düzeyde farklılık saptanmıştır (p<0.01). K₂ grubu ile EC₂ grubu; alveolar duvar kalınlaşması açısından karşılaştırdıklarında önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.05), alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, interalveolar hemoraji açısından karşılaştırdıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.01), hücreyel infiltrasyon açısından karşılaştırdıklarında ileri düzeyde farklılık saptandı (p<0.001). K₂ ve HA₂ grupları karşılaştırdıklarında tüm parametrelerde çok önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.01). M₂ ve EC₂ grupları karşılaştırdıklarında vasküler konjesyon açısından önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.05), alveolar duvar kalınlaşması, alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırdıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.01), interalveolar hemoraji ile hücreyel

infiltrasyon açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). M_2 ve HA_2 grupları interalveolar hemoraji açısından karşılaştırıldıklarında önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$), alveolar duvar kalınlaşması açısından karşılaştırıldıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$), vasküler konjesyon, hücrel infiltrasyon, alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). EC_2 ve HA_2 grupları interalveolar hemoraji, hücrel infiltrasyon açısından karşılaştırıldıklarında önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$), vasküler konjesyon, alveolar makrofaj artışı açısından karşılaştırıldıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$), alveolar duvar kalınlaşması açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). İkinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel olarak karşılaştırılmaları tablo 5.2.'de ve şekil 5.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.2 İkinci grupların akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırmaları

	ADK	VK	İAH	Hİ	AMA
K_2-M_2	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.001$	$p<0.01$	$p<0.01$
K_2-EC_2	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.001$	$p<0.001$	$p<0.05$
K_2-HA_2	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.001$	$p<0.01$	$p<0.01$
M_2-EC_2	$p<0.01$	$p<0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p<0.01$
M_2-HA_2	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$
EC_2-HA_2	$p>0.05$	$p<0.01$	$p<0.05$	$p<0.05$	$p<0.01$

** $p>0.05$ fark yok $p<0.05$ önemli düzeyde farklılık var, $p<0.01$ çok önemli düzeyde farklılık var, $p<0.001$ değeri 'ileri düzeyde farklılık var



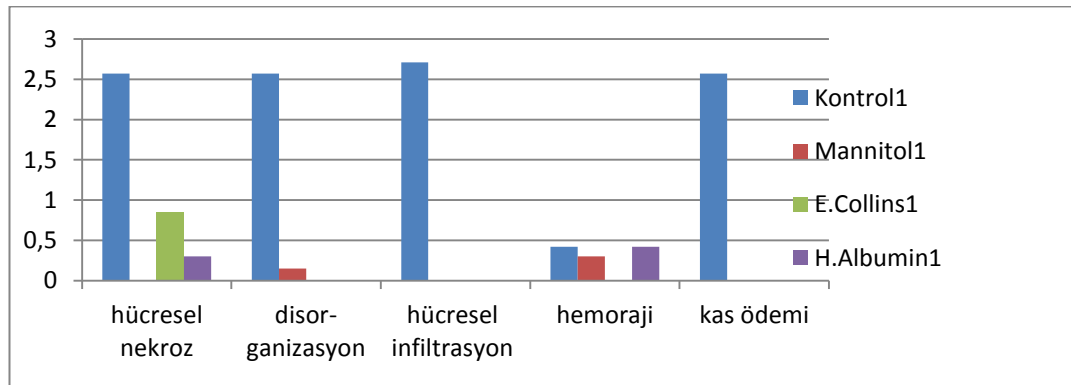
Şekil 5.2 İkinci grup içi akciğer dokularının istatistiksel karşılaştırmaları

Kas biyopsilerinde, K_1 ve M_1 grupları kendi aralarında, K_1 ve EC_1 grupları kendi aralarında, K_1 ve HA_1 grupları kendi aralarında hüresel nekroz, kas fibrillerinde disorganizasyon, hüresel infiltrasyon ve kas ödemi açısından karşılaştırıldıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$), hemoraji açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). M_1 ve EC_1 grupları kendi aralarında hüresel nekroz açısından kıyaslandıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.01$), kas fibrillerinde disorganizasyon, hüresel infiltrasyon hemoraji ve kas ödemi açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). M_1 ve HA_1 grupları kendi aralarında tüm parametreler açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). EC_1 ve HA_1 grupları kendi aralarında hüresel nekroz açısından karşılaştırıldıklarında önemli düzeyde farklılık saptandı ($p<0.05$), kas fibrillerinde disorganizasyon, hüresel infiltrasyon, hemoraji ve kas ödemi açısından karşılaştırıldıklarında fark saptanamadı ($p>0.05$). Birinci grup içi kas dokularının istatistiksel karşılaştırmaları tablo 5.3.'de ve şekil 5.3.'de gösterilmiştir.

Tablo 5.3 Birinci grupların kas dokularının istatistiksel karşılaştırılması

	HN	KFD	Hİ	HEM	KÖ
K_1-M_1	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.01$
K_1-EC_1	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.01$
K_1-HA_1	$p<0.01$	$p<0.01$	$p<0.01$	$p>0.05$	$p<0.01$
M_1-EC_1	$p<0.01$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$
M_1-HA_1	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$
EC_1-HA_1	$p<0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$	$p>0.05$

** $p>0.05$ fark yok $p<0.05$ önemli düzeyde farklılık var, $p<0.01$ çok önemli düzeyde farklılık var, $p<0.001$ değeri 'ileri düzeyde farklılık var



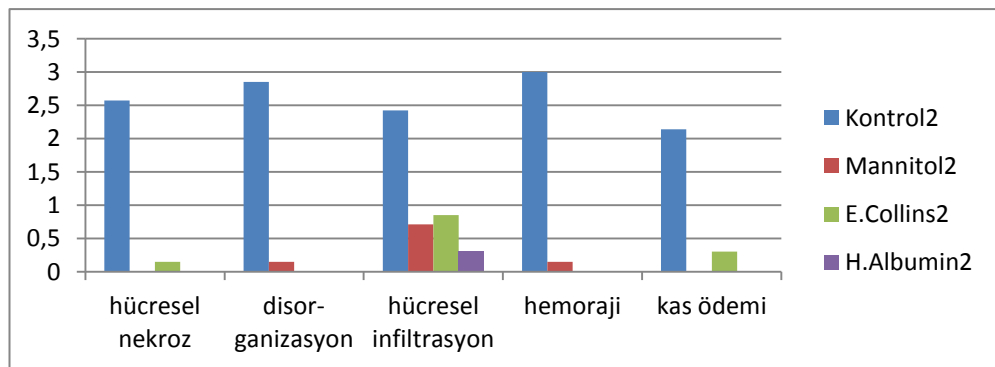
Şekil 5.3 Birinci grup içi kas dokularının istatistiksel karşılaştırmaları

Kas biyopsilerinde, K₂ ve M₂ grupları kendi aralarında değerlendirildiğinde; hücresel nekroz, kas fibrillerinde disorganizasyon, hücresel infiltrasyon ve kas ödemi açısından karşılaştırıldıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.01), hemoraji açısından karşılaştırıldıklarında ileri düzeyde farklılık saptandı (p<0.001). K₂ ve HA₂ grupları kendi aralarında değerlendirdiklerinde tüm parametreler açısından çok önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.01). K₂ ve HA₂ grupları hücresel nekroz, hücresel infiltrasyon ve kas ödemi açısından karşılaştırıldıklarında çok önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.01), kas fibrillerinde disorganizasyon ve hemoraji açısından karşılaştırıldıklarında leri düzeyde farklılık saptandı (p<0.001). M₂ ile EC₂ grupları kendi aralarında ve M₂ ile HA₂ grupları kendi aralarında karşılaştırıldıklarında tüm parametreler açısından fark saptanamadı (p>0.05). EC₂ ile HA₂ grupları kendi aralarında hücresel infiltrasyon açısından karşılaştırıldıklarında önemli düzeyde farklılık saptandı (p<0.05), diğer parametrelerde fark saptanamadı (p>0.05). İkinci grup içi kas dokularının istatistiksel karşılaştırmaları, tablo 5.4'de ve şekil 5.4'de gösterilmiştir.

Tablo 5.4 İkinci grupların kas dokularının istatistiksel karşılaştırmaları

	HN	KFD	Hİ	HEM	KÖ
K₂-M₂	p<0.01	p<0.01	p<0.01	p<0.001	p<0.01
K₂-EC₂	p<0.01	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.01
K₂-HA₂	p<0.01	p<0.001	p<0.01	p<0.001	p<0.01
M₂-EC₂	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
M₂-HA₂	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05	p>0.05
EC₂-HA₂	p>0.05	p>0.05	p<0.05	p>0.05	p>0.05

**p>0.05 fark yok p<0.05 önemli düzeyde farklılık var, p<0.01 çok önemli düzeyde farklılık var, p<0.001 değeri 'ileri düzeyde farklılık var



Şekil 5.4 Birinci grup içi kas dokularının istatistiksel karşılaştırmaları

5. TARTIŞMA

Rat alt ekstremite iskemi/reperfüzyon modelinde, alt ekstremitenin, %25'lik mannitol, insan serum albumini ve Euro Collins solüsyonları ile perfüzyonunun; iskemi/reperfüzyon hasarına etkilerinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada, iskemi oluşturmak için mikrovasküler klempler ile vasküler oklüzyon yöntemi kullanılmıştır(10,49,52,53,79,80). Her ne kadar noninvaziv ve kolay uygulanabilir oluşu nedeniyle turnike yöntemini savunan yazarlar olsada(3,23,47), uzamış mekanik kompresyon sonucu venöz ve lenfatik oklüzyon, kas ve sinir zedelenmesi yapabileceğinden dolayı bu çalışmada turnike yöntemi tercih edilmemiştir.

Alt ekstremitede iskemi/reperfüzyon hasarına perfüzyon solüsyonlarının etkilerinin araştırıldığı bu çalışmada; kolay temin edilebilmesi, deneysel iskemi/reperfüzyon hasarının araştırıldığı çalışmalarda daha çok rat kullanılmış olması, iskelet kası ile akciğerin ratlardaki iskemi/reperfüzyon hasarına verdiği yanıtın iyi bilinmesi ve bu çalışmada yer alan araştırmacıların ratlarla daha çok deneyiminin bulunması nedeniyle deney hayvanı olarak S.Dawley cinsi dişi ratlar kullanılmıştır(3,4,31,47,52,53,79,80).

Literatür incelendiğinde, farklı dokularda ve farklı iskemi/reperfüzyon sürelerinde; iskemik dokuların, reperfüzyon öncesi çeşitli solüsyonlarla perfüzyonu yapılarak iskemi/reperfüzyon hasarının azaltıldığı çalışmalar dikkati çekmiştir.

Bastiaanse ve ark.'nın; perfüzyon solüsyonlarının iskemi/reperfüzyon modelinde kapiller dolaşım üzerine olan etkilerini araştırdıkları çalışmada, rat kremaster kası pedikülü üzerinden kas flebi şeklinde kaldırılmıştır ve ratların batın insizyonu sonrası ana iliyak arterleri bulunarak kremaster kasının beslenmesini sadece pedikülüne bırakacak şekilde, tüm ana iliyak arter yan dalları bağlanmıştır. 4 ve 6 saatlik iskemi sürelerinin ardından, femoral arter kateterize edilerek Celsior ve HTK (histidin-triptofan-ketoglutarat) solüsyonları ile (kremaster kasının kanlanma debisine uyacak şekilde) 40 µl/dakika olacak şekilde toplam 10 dakika mikropump vasıtasıyla kremaster kasının perfüzyonu yapılmıştır. Perfüzyon işleminin ardından kremaster kası iki saatlik reperfüzyona bırakılmıştır. 4 saatlik iskemi sonrası perfüzyon yapılmayan grupta; lökosit adezyonu ve lökosit yuvarlanmasının oranı taban değer %310'una artmış iken, 4 saatlik iskeminin ardından solüsyonlarla perfüzyonun yapıldığı gruplarda lökosit adezyonunda ve lökosit yuvarlanmasında

kayda değer herhangi bir artış saptanmamıştır(4). Perfüzyon yapılmayan grupta, 4 saatlik iskemi sonunda mikrodolaşımın olduğu kapiller oranı %50 iken, iki saatlik perfüzyonun sonunda dolaşımın olduğu kapiller oranı %98 olarak bulunmuştur(4).

Tsuchida ve ark. (81)'nin belirttiğine göre, Rosen ve arkadaşları, fareler üzerinde yaptıkları çalışmada, preiskemik dönemde flep ve ampute alt ekstremitenin hücre içermeyen plazma ile perfüzyonunun flep ve alt ekstremitte yaşayabilirliğini artırdığını bulmuşlardır. Yine başka bir araştırmacı, bu reperfüzyon solüsyonlarına yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin eklenmesinin daha fazla etkili olduğunu göstermiştir(81).

Akın ve ark.'nın ratlarda yaptıkları çalışmada; ratların batin bölgesinde superficial inferior epigastrik arter pediküllü deri adası flebinde, 11 saatlik ılık iskeminin ardından deri adası flebinin, HAES (%10'luk hidroksietil solüsyonu) ile perfüzyonunun İ/R hasarına olan etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, 27 gauge'lik enjektör iğnesi kullanılarak deri adası flebi intravasküler yolla, HAES (%10'luk hidroksietil solüsyonu) solüsyonu ve normal saline ile yıkanmıştır (ortalama 20 dakika, 10-12 cc yıkama solüsyonları). Yıkama işleminin ardından flepler yerlerine sütüre edilerek bir haftalık reperfüzyona bırakılmıştır. Bir hafta sonunda flepteki nekrotik alanlar ile yaşayan alanların oranlamasını yapmıştır. Çalışmanın sonucunda Akın ve ark. iskemik kalan fleplerin, pedikülleri vasıtasıyla intravasküler olarak yıkanmasının etkili olduğunu, bu yıkanan ajanın farmakolojik olarak antioksidan veya antitrombotik olması durumunda elde edilecek sonucun çok daha fazla yüz güldürücü olduğu sonucuna varmışlardır(80).

Bu çalışmada, rat alt ekstremitesinde iskemi/reperfüzyon modeli oluşturularak, reperfüzyon öncesi iskemik dokunun, %25'lik mannitol, Human Albumin ve Euro Collins solüsyonları ile perfüzyonun, iskemi/reperfüzyon hasarına olan etkilerini araştırılmıştır. Literatür incelendiğinde; iskemi/reperfüzyon hasarını azaltmak için iskemik ön koşullama yapıldığı, sistemik yolla antienflamatuar veya antioksidan özellikli maddelerin kullanıldığı görülmüştür. İskemik ön koşullama; sonuçları her ne kadar başarılı olsada; plastik cerrahinin uğraşı alanı olan travmatik reimplantasyon prosedürlerinde uygulanması pek mümkün görünmemektedir. Bu nedenle oluşturulan modelde; iskemik kalan ekstremitte, 29 gauge'lik insülin enjektörü kullanılarak intravasküler yolla perfüze edilmiştir ve bu şekilde perfüzyon

solüsyonlarının direkt iskemik alana ulaştırılması hedeflenmiştir. Çalışmada solüsyonların verilmiş basıncı; herhangi bir mikropump veya yerçekimi etkisi kullanılarak standardize edilmemiş, sadece çalışmayı yapan tek cerrah tarafından manuel yapılan enjeksiyon basıncı kullanılmıştır. 3mg/kg dozda mannitol solüsyonu, 0.5 cc hacimde Euro Collins ve human albumin solüsyonları, 30 sn. ile 1 dakikalık zaman dilimi içerisinde uygulanmıştır. Operatör tarafından, perfüzyonun manuel olarak yapılması, verilmiş basıncı ölçümü ile standardizasyonunun yapılmasının avantajı; kliniğe uygulanabilirliğinin kolay olması ve gerçek bir acil cerrahi işlemi taklit etmesidir. Bu çalışmanın amacı ve kliniğe uygulanabilirliği, reimplantasyon öncesi amputatın veya serbest doku aktarımlarında aktarılan dokunun alıcı alana yerleştirilmeden önce çeşitli perfüzyon solüsyonları ile perfüze edilerek I/R hasarının lokal ve sistemik zararlarının azaltılabilirliğinin gösterilmesidir.

İskemi esnasında dokuda biriken ürünler, reperfüzyonla birlikte patlayıcı tarzda doku hasarına yol açmaktadır. Yapılan çalışmalarda, İskemi/reperfüzyon hasarının oluşturulması için dokuların iskemiye dayanıklılıkları göz önünde bulundurularak, çeşitli iskemi zamanları kullanılmıştır.

Enkaya ve ark.'nın, ratlar ile yaptıkları çalışmada; ilaç grubunda bulunan ratlara, deney gününden önce olmak üzere beş gün süre ile 50 mg/gün ticlopidin (antitrombositler ajan), orogastrik tüp aracılığı ile günde iki kez verilerek ön koşullama oluşturulmuştur. Çalışmada ratların sağ alt ekstremiteleri kalça eklemi hizasından turnike ile sıkılarak bir grupta sadece 4 saatlik iskemi, diğer gruplarda ise 4 saatlik iskeminin ardından 2 saatlik reperfüzyon uygulanmıştır. Çalışmanın sonucunda Enkaya ve ark. Alt ekstremitelerin 4 saatlik iskemi süresinin ardından yapılan iki saatlik reperfüzyonu ile uzak organ hasarı oluşturduğunu ve antitrombositler ajan olan tiklopidinin bunu engellediğini bulmuşlardır(3).

Cunha ve ark. ratlar ile yaptıkları çalışmada, rat alt ekstremitesinde; 2, 4, 6 ve 8 saatlik iskemi süreleri kullanılarak, alt ekstremitte pedikülünün korunduğu amputasyon modeli oluşturmuşlardır. Rat alt ekstremitelerinde; oda sıcaklığında belirlenen iskemi zamanlarına göre ılık iskemi oluşturulmuştur. Reperfüzyon süresi 7 gün olarak planlanmıştır. 7. Günün sonunda ratlar kurbanı edilerek alt ekstremitte sağkalımı açısından incelenmiştir. Deneklere uygulanan iskemi süreleri birbiri arasında kıyaslandığında; alt ekstremitte sağkalımı 2 saatlik iskeminin uygulandığı

grupta %80, 4 saatlik iskeminin uygulandığı grupta %64, 6 saatlik iskeminin uygulandığı grupta %50 ve 8 saatlik iskeminin uygulandığı grupta %20 olarak bulunmuştur. Çalışmanın sonunda yapılan istatistiksel analizde, 4 saatlik ve 6 saatlik iskemi süreleri arasında ekstremitte sağkalımı açısından anlamlı fark tespit edilememiştir(79).

Siemionov (5)'un belirttiğine göre, Buttermeyer ve ark. farklı iskemi zamanlarında, vücutta oluşan superoksit radikali miktarını sitokrom c-bazlı biyosensör vasıtasıyla ölçmüşler ve superoksit radikalinin en yüksek değerlerine iki saatlik iskemi sonrası ulaştığını, iskemi/reperfüzyon sürelerinin arttırılmasının oluşan doku hasarını arttırdığını göstermişlerdir.

Yukarıdaki makaleler ve literatür incelendiğinde; iskelet kasında iskemi/reperfüzyon hasarının oluşması için farklı iskemi ve reperfüzyon sürelerinin tercih edilmiş olması dikkat çekici bulunmuştur. Bu çalışmalarda, iskemi süresinin etkilenmesi beklenen organların iskemiye dayanıklılığı temel alınarak belirlendiği gözlenmiştir. Örneğin, kas dokusunda belirgin morfolojik değişikliklerin 2 saatlik iskemiden sonra oluşmaya başlaması nedeniyle, iskelet kası iskemi/reperfüzyon hasarının değerlendirildiği çalışmalarda çoğunlukla daha uzun iskemi süreleri tercih edilmiştir. İskemi süreleri ile iskemik hasarlanma arasında önemli bir korelasyon olduğu gösterilmiştir. İskemi/reperfüzyon hasarının hedef dokusu olarak iskelet kasının seçildiği çalışmalarda, 4 saatlik iskemik dönemden sonra kas dokusunda geri dönüşümsüz histolojik hasarlanmanın başladığı ve yaygın nötrofil birikiminin oluştuğu; 4 saatlik iskemi süresi ile 6 saatlik iskemi süresinde oluşan hasar bakımından istatistiksel olarak fark bulunmadığı ve 8 saatlik iskemi süresinde geri dönüşümsüz hasarlanmanın tam oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu veriler göz önünde bulundurularak bu çalışmada iskemi süresinin 4 saat olarak uygulanmasına karar verilmiştir(10,79,82).

İ/R'un gerek lokal, gerekse uzak organlara etkilerinin araştırıldığı deneysel çalışmalarda, oluşan hasarın derecesinin reperfüzyon süresine de bağlı olduğu bilinmektedir(10,48,49).

Teruya ve ark.'nın ratlarda yaptıkları çalışmada; 6 saatlik sol alt ekstremitte iskemisinin ardından 4 ve 24 saatlik reperfüzyon sürelerinin uygulandığı iki ana grup oluşturulmuştur. Reperfüzyon sürelerinin sonunda ratlar kurban edilerek

plazmada kreatin, kreatin kinaz, üre, sodyum ve potasyum çalışılması için kan alınmıştır ve histolojik inceleme için sol nefrektomi yapılmıştır. Çalışmanın sonucunda, alt ekstremitte iskemisinin; plazma kreatin, kreatin kinaz, üre, sodyum ve potasyum değerlerinde artışa neden olduğu dolayısıyla kas iskemisi sonucunda böbrek hasarının gerçekleştiği gösterilmiştir. Histolojik incelemede; böbrek dokusundaki tübüler nekrozun ve ödemin 4 saatlik reperfüzyon yapılan grupla, 24 saatlik reperfüzyon yapılan grup arasında aynı bulunmuştur(83).

I/R hasarında farklı reperfüzyon sürelerinin uzak organlardaki etkilerini araştıran Yassin ve ark. (84), reperfüzyon süresinin uzaması ile uzak organ fonksiyon bozukluklarının artışı arasında paralellik olduğunu gözlemişlerdir. Aynı çalışmada, çalışmacılar akciğer dokusundaki histopatolojik değişikliklerin 1 ve 2 saatlik reperfüzyon sürelerinde oluşmadığını, ancak 3 saatlik reperfüzyonun sonunda saptanabilir düzeylere ulaştığını belirlemişlerdir.

Literatür incelendiğinde iskemi/reperfüzyon hasarının uzak organlara olan etkilerinin araştırıldığı diğer çalışmalarda ise, 4 saatlik reperfüzyon süresinin seçilmiş olması dikkat çekici bulunmuştur(10,48,49). Bu çalışmada kullanılan reperfüzyon süreleri, birinci kontrol gruplarında bulunan deneklerin akciğerlerinde; periarteriyal hücrel infiltrasyon, alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, bronşiol epitel hücrelerinde yoğun dejenerasyon ve dökülmeler ile interalveolar hemoraji gibi değişikliklerle karakterli ciddi akut akciğer hasarı bulguları oluşturmuş ve bu çalışmada kullanılan 4 saatlik erken reperfüzyon süresinin akut akciğer hasarının oluşumu için yeterli olduğu; 7 günlük reperfüzyon süresi uygulanan deneklerin akciğerlerinde yukarıdaki bulgulara ek olarak interalveolar alanlarda hücrel infiltrasyon ve hemoraji ile alveolar makrofajların sayıca arttığının görülmesi, 4 saatlik iskeminin ratlarda ölümcül akut akciğer hasarına yol açmadığını, bununla birlikte 4 saatlik reperfüzyon süresinin artırılmasıyla oluşacak olan akciğer hasarının da artacağını göstermiştir. Bu bilgiler ışığında, birinci gruplarda, 4 saatlik iskeminin ardından 4 saatlik reperfüzyon süresi uygulanarak iskemi/reperfüzyon hasarının akut etkileri araştırılmış, ikinci gruplarda ise; 4 saatlik iskeminin ardından 7 günlük reperfüzyon süresi uygulanarak sağkalım araştırılmıştır. İkinci gruplarda rat kaybının yaşanmaması, literatürle de korele olarak 4 saatlik iskemi süresinin;

ratlarda deneysel iskemi/reperfüzyon hasarı modellerinde uygulanabilirliğini göstermiştir(1,79).

İskemi/reperfüzyon hasarı, hipotermi ile azaltılabilmektedir. Hipotermide, metabolizma hızının yavaşlaması nedeniyle, daha az serbest oksijen radikali oluşumu dolayısıyla da daha az doku yıkımı olmaktadır.

Dick ve ark. ratlar üzerinde alt ekstremite iskemisi oluşturup yeni kontrollü reperfüzyon metodlarını araştırmışlardır. Bu amaçla yapılan çalışmada; rat alt ekstremitesinde, 4 saatlik iskemi süresinin ardından; 15 derece sıcaklıkta, milimetresinde 1 IU heparin olan ringer laktat solüsyonu, mikropump vasıtasıyla dakikada 0.3 ml olacak şekilde, 20 dakika reperfüzyon yapılmıştır. Femoral vene yapılan insizyondan, verilen solüsyon boşaltılarak alt ekstremite venöz yatakta kalmış olan kan temizlenmiştir. Reperfüzyon sonunda ratlar sakrifiye edilerek; alınan gastroknemius kas örneklerinde doku yaşayabilirliği ve doku ödemi; alınan soleus kas örneklerinde ise kas uyarılabilirliği ve kasılabilirliği araştırılmıştır. Çalışmanın sonucunda, reperfüzyon öncesi ekstremitenin intravasküler yolla; hipotermik reperfüzyon solüsyonları kullanılarak yıkanmasının iskemi/reperfüzyon hasarını azaltmada olumlu etkisinin olduğu gösterilmiştir(10).

Ege ve ark.'nın ratlarda iskemi/reperfüzyon hasarına lokal hipotermi uygulamasının etkisinin araştırıldığı çalışmada; ratlarda alt ekstremitesi oluşturulmuştur ve aynı ekstremiteden kaldırılan gracilis kas fleplerine bir grupta, 25 derecede lokal hipotermi uygulanmıştır. Reperfüzyon süresinin sonunda gracilis kasından örnekler alınarak, intertisyel doku ödemi, inflamasyon tipi ve yoğunluğu açısından incelemeler yapılmıştır. Buna göre, hipotermi uygulanmayan grupta intertisyel doku ödemi ve inflamasyon daha fazla olduğu görülmüştür. Çalışmanın sonucu, iskemi ve reperfüzyon dönemlerinde uygulanan lokal hipoterminin, iskemi/reperfüzyon hasarını azaltmada etkili olduğu bulunmuştur(85).

Silva ve ark.'nın ısı lambası altında tutularak 37 decelelik vücut sıcaklığı oluşturulan ratlar ile yaptıkları çalışmada; ratlara 2 saatlik iskeminin ardından ve 4 saatlik reperfüzyona uygulanmıştır. İ/R hasarının azaltılması için ilaç grubuna 10µmol/kg dozunda intra peritoneal CAPE (kafeik asit fenil ester) uygulanmıştır. Reperfüzyon süresinin sonunda ratlar sakrifiye edilerek, histolojik inceleme için gastroknemius kas biyopsisi alınmıştır. Histolojik incelemede, kas dokusunda;

disorganizasyon, kas fibrillerinde yıkım, intertisyel ödem ve lökosit hücre göçü değerlendirilerek histolojik skorlama yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde, 37 derecelik vücut sıcaklığında İ/R hasarının; gastroknemius kasında kas fibrillerinde disorganizasyona ve yıkıma, intertisyel ödeme ve lökosit hücre göçüne neden olduğu ve bu bulguların CAPE ile azaltıldığı bulunmuştur(48).

Literatür incelendiğinde, iskemi/reperfüzyon hasarının lokal veya sistemik hipotermi ile azaldığı görülmüştür. Bununla birlikte bu çalışmada kullanılan solüsyonların iskemi/reperfüzyon hasarına olan etkilerinin daha anlaşılır olması ve iskemi/reperfüzyon hasarını azaltacak veya artıracak faktörlerin çalışma dışında bırakılması amacıyla çalışma oda sıcaklığında yapılmıştır(79).

Alaşam ve ark.'nın ratlar ile yaptıkları çalışmada; ratlar, abdominal aortalarına klemp konularak 30 dakika iskemi süresinin ardından 60 dakika reperfüzyona bırakılmıştır. İlaç grubunda, klemp kaldırılmadan 10 dakika önce, antioksidan özelliği olan 250 mg/kg karnozinin (β -alanyl-L-histidin) intraperitoneal yolla verilmiştir. Tüm gruptaki ratlar reperfüzyon süresinin tamamlanmasıyla sakrifiye edilip histolojik inceleme için akciğer doku örnekleri alınmıştır. Bu çalışmanın sonucunda, alt ekstremitte iskemisinin, akciğerlerde serbest oksijen radikallerine bağlı hasar oluşturduğu ve bu hasarın antioksidan özellikleri olan karnozin tarafından engellendiği gösterilmiştir(52).

İsbir ve ark.'nın ratlarda yaptıkları çalışmada; akut alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarında, akciğerlerde hasar olduğu ve gelişen patolojik değişikliklerin temelinde olası diğer faktörlerle birlikte serbest oksijen radikallerinin de yer aldığı sonucuna varılmıştır(53).

Tekeli ve arkadaşlarının, alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarının akciğerlerde oluşturduğu hasarın önlenmesine yönelik yaptıkları çalışmada; ratlar dört guruba ayrılmış, kontrol grubuna 3 gün boyunca intraperitoneal serumfizyolojik, ilaç gruplarına da immunsupresif etkileri olan takrolimus; intraperitoneal yolla farklı dozlarda enjekte edilerek 4. gün alt ekstremitte turnike ile 2 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon yapılmıştır. Ardından ratlar sakrifiye edilerek akciğer dokuları çıkartılmıştır. Histopatolojik incelemede kontrol grubu akciğer dokusunda ışık mikroskopunda, alveolar yapı bozulmuş, intertisyel ve periarterioller ödem ve artmış

lökositik infiltrasyon gözlenmiştir. Bununla birlikte takrolimus kullanılan ilaç gruplarında akciğer hasarı gözlenmemiştir(47).

Literatür incelendiğinde iskemi/reperfüzyon hasarının uzak etkilerinin böbrekler ve akciğerlerde daha fazla araştırıldığı gözlenmiştir. Bu çalışmada, iskemi/reperfüzyon hasarının uzak organ etkilerinin incelenmesi için; literatürde de belirtilidği gibi alt ekstremitte İ/R hasarından en fazla etkilenen organın akciğer olması, retroperitoneal olmaması nedeniyle biyopsi için uzun zaman gerektirerek reperfüzyon sonrası ikincil bir iskemi zamanı oluşturmaması ve %10'luk formalin solüsyonunda, gözenekli yapısından dolayı daha kolay ve daha iyi fiske edilebilmesi gibi nedenlerle uzak organ hasarının değerlendirilmesi amacıyla akciğer tercih edildi. Bu çalışmada, rat akciğerlerinde histolojik incelemede, alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, interalveolar hemoraji, hücrel infiltrasyon ve alveolar makrofaj artışı parametreleri açısından ışık mikroskobu ile inceleme yapıldı ve oluşan hasar miktarı istatistiksel inceleme için skorlandı. Çalışmanın sonuçlarında; birinci kontrol grubu deneklerin akciğerlerinde; periarteriyal hücrel infiltrasyon, alveolar duvar kalınlaşması, vasküler konjesyon, bronşiol epitel hücrelerinde yoğun dejenerasyon ve dökülmeler ile interalveolar hemoraji görülmesi İ/R modelinin başarılı olduğunu göstermektedir. İkinci kontrol grubu deneklerinin akciğerlerinde, interalveolar alanlarda hücrel infiltrasyon ve hemoraji ile alveolar makrofajların sayıca arttığı gözlenmesi uzun süreli reperfüzyonda hasarın devam ettiğini göstermektedir. Bununla birlikte, perfüzyon solüsyonlarının kullanıldığı gruplarda normale yakın akciğer dokusunun görülmüş olması cerrahi tekniğin ve kullanılan perfüzyon solüsyonlarının etkili olduğunun bir göstergesidir.

Literatürde, hemen hemen tüm organlarda iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulmuş olmasına karşın en fazla iskelet kasında çalışmalar yapılmıştır.

Crinnion ve ark.'nın, ratlar üzerinde yaptıkları çalışmada, rat alt ekstremitesi uyluk proksimalinden sıkılan turnike ile 6 saatlik iskemi dönemine ve 4 saatlik reperfüzyon dönemine bırakılmıştır. İlaç grubuna, intravenöz 1 ml Anti-Mac-1 antikoru (IgG) verilmiştir ve çalışmada uygulanan iskemi/reperfüzyon modelinin aynısı uygulanmıştır. Çalışma sonunda ratlar kurban edilerek, gastroknemius kas biyopsileri; histolojik olarak nötrofil miktarı, kas canlılığı ve kas ödemi incelenmek üzere alınmıştır. Sonuç olarak, Anti-Mac-1 antikorunun, lökositlerin endotele

adezyonunu, dolayısıyla dokuya göçünü engelleyerek post iskemik doku hasarını azalttığını bulmuşlar(31).

Bu çalışmada, yukarıdaki çalışmaya benzer şekilde soleus kas biyopsilerinde histolojik inceleme ile kasta hücre sel nekroz, kas ödemi, kasa inflamatuvar hücre infiltrasyonu, kas fibrillerinde disorganizasyon ve kasta hemoraji parametreleri çalışılarak skorlama yapıldı. Kontrol gruplarına ait deney hayvanlarından alınan kas dokusu örneklerinin ışık mikroskopik incelemesinde birinci kontrol grubunda; nekrotik kas fibrilleri, yoğun hücre sel infiltrasyon ve ödem görülmesi; ikinci kontrol grubunda da; bu bulgulara, kas fibrillerinde disorganizasyon, kas fibrilleri arasında hemoraji ve merkezi yerleşimli çekirdekleriyle rejenerasyon gösteren kas fibrillerinin görülmesi; 4 saatlik reperfüzyon süresinin arttırılmasıyla kas hasarının da artacağını; bununla birlikte; kas hasarının, kullanılan iskemi süresine bağlı olarak belli bir noktaya geldikten sonra durup rejenerasyon safhasının başlayacağını göstermektedir. Bulgular literatür ile koreledir.

Mannitol osmolar özellikleri ve hidroksil radikali toplayıcı etkisi ile iskemi/reperfüzyon modellerinde sıklıkla kullanılmıştır.

Weinbroum'un ratlarla yaptığı çalışmada; karaciğer iskemi/reperfüzyon hasarında mannitolün farklı dozlarda kullanılmasının akciğer hasarına olan etkileri araştırılmıştır. Oluşturulan çift organ modelinde rat karaciğerleri iki saat iskemik bırakılmıştır. İskemi süresinin ardından karaciğer ve akciğer birlikte; kontrol gruplarında sadece Krebs-Henseleit solüsyonu ile, çalışma gruplarında Krebs-Henseleit solüsyonu içine katılan 0.22mMol, 0.55mMol, 0.77 mMol ve 1.1 mMol'lük mannitol solüsyonu ile reperfüzyon yapılmıştır. Çalışma sonucunda 0.22 ve 1.1 mM'lük mannitol dozlarının akciğerlerde iskemi/reperfüzyon hasarını önlemede kullanılan diğer dozlara göre daha az efektif olduğu; 0.77 mM'lük mannitol dozunun, akciğerlerde iskemi/reperfüzyon hasarını önlemede daha başarılı olduğu; bununla birlikte, 0.55 mM'lük mannitol dozununda akciğerlerde iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığı gösterilmiştir(86).

Weinbroum'un ratlarla yaptığı başka bir çalışmada ise, klinik olarak kullanılan ajan olan mannitolün, hidroksil radikali bağlamasından kaynaklanan antioksidan özelliğinin, iskemi/reperfüzyon hasarına olan etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmada, rat pankreasında oluşturulan iskemi/reperfüzyon modelinde, akciğerler 45

dakikalık reperfüzyon süresinin ilk 15 dakikasında farklı dozlarda mannitol solüsyonları ile perfüze edilmiştir. Çalışma sonucunda yukarıdaki makale ile aynı sonuçlar bulunmuştur(66).

Khoury ve ark.'nın ratlar ile yaptıkları çalışmada; pankreas iskemi/reperfüzyon modelinde böbreklerde oluşan iskemi/reperfüzyon hasarının mannitol ile azaltılabilirliği incelenmiştir. Çalışmada, pankreas iskemisi sonrası kontrol gruplarında işlem yapılmamış; tedavi gruplarında ratlar 250 mg/kg dozda mannitol ile tedavi edilmiştir. Çalışmanın sonucuna göre 250 mg/kg dozda mannitol ile tedavi, pankreas-böbrek çift organ iskemi/reperfüzyon modelinde; pankreasta ve böbreklerde iskemi/reperfüzyon hasarının oluşumunu engellediği bulunmuştur(87).

Kostopanagiotou ve ark.'nın, mannitolün antioksidan etki olarak lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermek için yaptıkları klinik çalışmada; karaciğer rezeksiyonu yapılan hastalardan oluşturulan bir guruba, rezeksiyon öncesi hepatik kan akımını durdurmadan yarım saat önce 1.5 ml/kg dozunda %20 lik mannitol solüsyonunu, diğer gurubada 1.5 mg/kg dozda normal saline solüsyonunu intravenöz yolla vermişler ve post operatif 6 günlük dönemde hastalardan venöz kan örnekleri alarak lipid peroksidasyon göstergesi olan serum MDA düzeylerini çalışılmıştır. Çalışmanın sonucunda, normal saline verilen grupta serum MDA düzeyleri yüksek iken, %20 mannitol verilen grupta serum MDA düzeyleri düşük bulunmuştur. Bu sonuçlarda mannitolün lipid peroksidasyonunu önlediğini göstermektedir(88).

Sağöz ve ark.'nın ratlar ile yaptıkları çalışmada, abdominal insizyon sonrası rat overi bulunup vasküler pedikülü klemplenecek 4 saatlik iskemiye bırakılarak over torsiyon taklidi oluşturulmuştur. İskeminin ardından overler 1 saatlik reperfüzyona bırakılmıştır. Tedavi gruplarına; 4 saatlik iskeminin sonunda, sırasıyla 50 mg/kg dozda vitamin C, 3 mg/kg dozda %20'lik mannitol, 0.3 mg/kg dozda verapamin verilmiştir. Reperfüzyon dönemlerinin sonunda overler çıkartılarak histolojik inceleme (konjesyon, kanama, ödem ve kohezyon kaybı) ve lipid peroksidasyon belirteci olan Thiobarbituric acid reactive substance (TBARS) ölçümü yapılmıştır. Veriler değerlendirildiğinde; vitamin C ve mannitol gruplarında, kontrol grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı farklılıkların olduğu; verapamil grubunda fark bulunmadığı tespit edilmiştir. Çalışmanın sonucunda; vitamin C'nin ve mannitolün iskemi/reperfüzyon hasarını anlamlı ölçüde azalttığı sonucuna varılmıştır(63).

Günel ve ark.'nın tavşanlarda yaptıkları çalışmada, mezenter arter klemplenerek 60 dakika mezenterik iskemi, 60 dakika reperfüzyon süreleri ile iskemi/reperfüzyon modeli oluşturulmuştur. Dört ilaç grubuna sırasıyla 10 mg/kg dozda intramüsküler vitamin E, 10 mg/kg dozda intramüsküler vitamin C, 30 mg/kg dozda intravenöz metilprednizolon, intravenöz infüzyonla 3 mg/kg dozda %20'lik mannitol solüsyonu verilmiştir. Reperfüzyon süresinin ardından sakrifiye edilen tavşanlardan alınan incebarsak örnekleri histopatolojik olarak incelenmiştir. Çalışmanın sonucunda mannitol mezenterik iskemi/reperfüzyon modelinde iskemi/reperfüzyon hasarını azaltıcı etki göstermiştir. Çalışmacılar bu etkinin oluşmasını, mannitolün mezenterik kan akımını artırıcı etkisine ve serbest oksijen radikali toplayıcı etkisi sonucu oluştuğu; mannitolün mikrosirküler akımı düzenleyici etkisi ile iskemi/reperfüzyon hasarında görülen no-reflow fenomeni mannitol tedavisi sonrası görülmediği tespit edilmiştir(64).

Yukarıdaki makaleler ve literatür incelendiğinde; mannitolün, hidroksil radikal toplayıcı olan antioksidan özelliği, makromolekül olarak dolaşım düzenleyici ve iskemik dokuda kan akımını artırıcı özellikleri ile iskemi/reperfüzyon hasarını azaltmada etkili olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca kolay ulaşılabilir olması, tedavi maliyetinin düşük olması gibi nedenlerle bu çalışmada reperfüzyon solüsyonlarından biri olarak mannitol kullanılmıştır. Literatür incelendiğinde; iskemi/reperfüzyon hasarının azaltılmasında kullanılan mannitol dozları arasında farklılık bulunduğu dikkati çekmiştir. Bununla birlikte; iskemi/reperfüzyon hasarında sıklıkla 3g/kg dozda mannitol solüsyonunun kullanıldığı görülmüştür. Bu çalışmada da; 3g/kg dozda %25 lik mannitol solüsyonu, mikrovasküler klemp ile oklüzyonu yapılmış femoral arterden intravasküler yolla direkt, iskemide olan alt ekstremiteye uygulanmıştır. Solüsyonun uygulanması esnasında femoral vene klemp konularak verilen solüsyonun alt ekstremitede oluşan strese sekonder açılmış olan şantlardan ekstremitede distaline ulaşmadan sistemik dolaşıma katılması engellenmiştir. Mannitol verilen gruplardaki akciğer örnekleri incelendiğinde, histolojik olarak normale yakın akciğer dokusunun görülmesi ve bu grupların histolojik skorlamasının, kontrol grupları akciğer dokularının histolojik skorlaması ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, mannitol verilen grupta ileri düzeyde farklılık saptanması; mannitolün iskemi/reperfüzyon hasarının uzak organlarda yaptığı yıkımı azalttığını

göstermektedir. Yine aynı şekilde; mannitol verilen gruplarda, kas doku örnekleri incelendiğinde, histolojik olarak normale yakın kas dokularının görülmesi ve bu grupların kas dokularının histolojik skorlaması, kontrol grupları kas dokularının histolojik skorlaması ile istatistiksel olarak karşılaştırıldığında, mannitol verilen grupta ileri düzeyde farklılık saptanması; mannitolün iskelet kası iskemi/reperfüzyon hasarının azaltılmasında etkili olduğunu göstermektedir. Bu bulgular literatür ile koreledir(63,34,66,86-88).

İnsan serum albumini, ligand bağlama ve taşıma fonksiyonu, antioksidan özelliği ve enzimatik aktivitesi olan multifonksiyonel bir polipeptit'dir. Serbest oksijen radikallerine karşı enzimatik olmayan savunmada öncelikle serum proteinleri ve bunlar arasında da en önemlisi olan serum albümini yer almaktadır(69). Yapılan çalışmalarda, albuminin plazma lipoproteinlerini bakır aracılı oksidasyondan; kan elemanlarını ise serbest radikaller tarafından hemoliz edilmekten koruduğu gösterilmiştir (70). İnsan serum Albumin, ilaçlar, yağ asitleri, Cu^{++} ve Zn^{++} gibi metaller, amino asitler, serbest radikaller başta olmak üzere birçok endojen ve eksojen maddelere bağlanarak onları taşımakta, nötralize etmekte ve antiosidan savunmayı sağlamaktadır(69,70). Albumin, nötrofil kaynaklı olan hidrojen peroksit, süperoksit, ve hipoklorikasit gibi serbest oksijen radikallerini toplayarak oksidatif stresin azaltılmasına katkıda bulunur. Ayrıca karaciğer ve böbrek yetmezliğine neden olan karbontetraklorid ve üremik toksinleri kendine bağlayarak antioksidan özellik gösterir(69,70,73).

Süzer ve ark.'nın yaptıkları çalışmada; izole rat myokard iskemi/reperfüzyon modelinde; St.Thomas Hospital kardioplejik solüsyonuna insan serum albuminin katılmasının kalp kası iskemi/reperfüzyon hasarını önlediği gösterilmiştir(89).

Bu çalışmada ikinci perfüzyon solüsyonu olarak, 0.5 cc %20'lik insan serum albumini kullanılmıştır. Birinci ve ikinci gruplardaki insan serum albumini verilen deneklerin akciğerleri, kontrol grupları deneklerinin akciğerleri ile karşılaştırıldığında, insan serum albumini verilen gruplarda normale yakın akciğer dokusunun görülmesi, insan serum albumininin iskemi/reperfüzyon hasarının uzak organ etkilerini azalttığı görülmüştür. Yine aynı şekilde; Birinci ve ikinci gruplardaki insan serum albumini verilen deneklerin iskelet kas biyopsileri, kontrol grupları deneklerinin iskelet kas biyopsileri ile karşılaştırıldığında; insan serum albumini

verilen gruplarda normale yakın kas dokusunun görülmesi, insan serum albumininin, iskelet kasındaki iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığını göstermektedir.

Dengeli iyon ve glukoz çözeltisi olan Euro Collins Solüsyonu; yıllardır organ transplantasyonlarında yıkama solüsyonu olarak kullanılmaktadır. Düşük sıcaklıklardaki Euro Collins Solüsyonu ile nakledilecek organın intravasküler perfüzyonu yapılarak vücut dışında kalma süresini uzatılmaktadır.

Tsuchida ve ark.'nın yaptığı çalışmada; ampute rat alt ekstremitesi Euro Collins ve University Of Winscontin solüsyonlarıyla perfüze edilerek dokuda ATP seviyesinin tayini ile sadece iskemi hasarı araştırılmıştır. EC ve UW ile perfüzyonun yapılacağı gruplarda, femoral arter 24 gauge'lik kateter vasıtasıyla kanülize edilerek iskemi boyunca EC ve UW solüsyonlarıyla perfüzyon sağlanmıştır. 4 ve 5 saatlik iskemi zamanının ardından soleus kasından örnekleme yapılmıştır. Çalışma sonucunda; kontrol grubu ile perfüzyon yapılan gruplar arasında doku ATP seviyeleri açısından anlamlı fark bulunmuştur. Ayrıca, UW solüsyonun EC solüsyonuna göre 5 saatlik iskemide doku ATP seviyelerini daha fazla koruduğu; 4 saatlik iskemide, her iki solüsyon arasında doku ATP seviyeleri açısından anlamlı fark olmadığı bulunmuştur(81).

Yukarıdaki makale ve literatür incelendiğinde; Euro Collins Solüsyonu'nun iskemik dokuda ATP kullanımını azalttığı ve serbest oksijen radikallerinin ana kaynağı olan mitokondriden bu radikallerin serbestlenmesini azaltarak iskemi/reperfüzyon hasarını önlediği görülmüştür. Bu çalışmada; perfüzyon solüsyonlarından üçüncüsü olarak Euro Collins Solüsyonu tercih edilmiştir. Literatür incelendiğinde akciğer transplantasyonlarında Euro Collins Solüsyonu kullanılmıştır ve içerdiği yüksek K^+ değerleri nedeniyle pulmoner vazokonstriksiyona ve akciğer ödeme neden olduğu bildirilmiştir(77,78). Birinci ve ikinci gruplardaki Euro Collins Solüsyonu verilen deneklerin akciğerleri, kontrol grupları deneklerinin akciğerleri ile karşılaştırıldığında; Euro Collins Solüsyonu verilen gruplarda normale yakın akciğer dokusunun görülmesi, Euro Collins Solüsyonunu'nun iskemi/reperfüzyon hasarının uzak organ etkilerini azalttığını göstermektedir. Biz bu etkinin pulmoner vazokonstriksiyona bağlı, iskemi/reperfüzyon hasarının uzak organ yıkıcı etkisinin akciğerlere daha az kan akımı ile azaltılarak, tamponlama sistemlerine daha fazla zaman kalması ile oluştuğunu düşünmekteyiz. Birinci ve

ikinci gruptaki Euro Collins Solüsyonu verilen deneklerin iskelet kas biyopsileri, kontrol grupları deneklerinin iskelet kas biyopsileri ile karşılaştırıldığında; Euro Collins Solüsyonu verilen grupta normale yakın kas dokusunun görülmesi, Euro Collins Solüsyonunun, iskelet kasındaki iskemi/reperfüzyon hasarını azalttığını göstermektedir.

6. SONUÇ VE ÖNERİLER

Bu çalışmada, spesmenlerin ışık mikroskopik incelemesinde, birinci ve ikinci gruplar kendi aralarında değerlendirildiğinde; kontrol gruplarına göre mannitol, Euro Collins ve Human Albumin solüsyonları iskemi/reperfüzyon hasarını azaltıcı etki göstermiştir. Bu çalışmanın sonuçları, literatürdeki benzer çalışmaların sonuçları ile kıyaslandığında; sonuçların daha iyi olduğu; literatürdeki benzer çalışmalara oranla bu çalışmada iskemi/reperfüzyon hasarının daha fazla engellendiği tespit edilmiştir. Bunun nedeninin, perfüzyon solüsyonlarının sistemik dolaşıma katılmadan direkt iskemik bölgeye alıcı arteri vasıtasıyla uygulanması olduğunu düşünmekteyiz. İskeminin ekstremitelerde bir stres durumu oluşturması nedeniyle arterio-venöz şantlar açılmakta ve iskemik alana verilecek olan solüsyon, distale ulaşmadan sistemik dolaşıma geçmektedir. Bu durum iskemik alanı drene eden ana vene klemp konularak venöz drenajın durmasını sağlayarak engellenebilir. Bununla birlikte venöz dolaşıma geçmiş olan solüsyonlar, venüller seviyesinden dokuya daha kolay nüfuz edebilmektedir.

Bu çalışmada perfüzyon basıncının manuel olarak ayarlanması intravasküler yolla perfüzyon solüsyonlarının verilmesi; gerçek bir cerrahi işlemi simüle etmektedir. Ayrıca uygulanan cerrahi yöntem; reimplantasyon cerrahilerinde veya serbest doku aktarımlarında kolaylıkla uygulanabilir bir yöntem olarak görünmektedir.

KAYNAKLAR

1. Baker L, Corry R. Oxygen free radical induced damage in kidneys subjected to warm ischemia and reperfusion. *Ann. Surg* 1985; Vol. 202 628-641
2. Yetkin U, Gürbüz A. Akut arter tıkanmalarına genel bakış. *Van Tıp Dergisi*, 2002; 9 (1):38-46
3. Granger N. Ischemia-Reperfusion: Mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease. *Microcirculation* 1999; 6: 167–178
4. Bastiaanse J, Slaaf D W, Egbrink M G.A, Boeckx W D, Kon M. Do preservation solutions protect rat cremaster microcirculation during ischemia and reperfusion? *J. Surg. Res.* 2005; 125:182–188
5. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/Reperfusion Injury: A review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24:468–475
6. Carden D. Granger N. Pathophysiology of ischaemia/reperfusion injury. *Journal of Pathology* 2000; 190: 255-266.
7. Saraç A, Akar H, Yıldız L, Kolbakır F, Keçeligil T. Karnitin ve C vitaminin reperfüzyon hasarına olan etkilerinin araştırılması. *TGKDCD* 2000; 8:1, 520-3
8. Blaisdell F W. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: A review. *Cardiovascular Surgery* 2002 ;10:620–630
9. Menger D. Vollmar B. Pathomechanisms of Ischemia-Reperfusion Injury as the Basis for Novel Preventive Strategies: Is It Time for the Introduction of Pleiotropic Compounds?. *Transplantation Proceedings* 2007; 39:485–488
10. Dick F, Li J, Giraud M-N, Kalka C, Schmidli J, Tevæearai H. Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb circulation. 2008;118:1920-1928
11. Bilal M, Sarioğlu T. İskemik miyokard injurisi ve intraoperatif miyokard korunmasına genel bir bakış. *GKD Cer. Derg.* 1992;1: 118-126
12. Lahiri S. Historical perspectives of cellular oxygen sensing and responses to hypoxia. *J Appl Physiol* 2000; 88:1467-1473
13. Kumar V. Abbas A. Fausto N Mitchell R. Robbins Basic Pathology. W.B.Saunders Elsevier 8th Edition 2007; chapter 1: cell injury, cell death and adaptation:1-31; chapter13;the lung:482

14. Branda M, Roselino J, Piccinato C, Cherri J. Mitochondrial alterations in skeletal muscle submitted to total ischemia. *J. Surg. Res.* 2003; 110: 235–240
15. Davies K J A. Oxidative stress, antioxidant defenses, and damage removal, repair, and replacement systems. *JUBMB Life* 2000;50: 279–289
16. Eltzschig H K, Collard C D. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *British Medical Bulletin* 2004; 70: 71–86
17. Ranjan K, Dash, Yanjun L, Kim J, Beard D A, Saidel G M, Cabrera M E. Metabolic dynamics in skeletal muscle during acute reduction in blood flow and oxygen supply to mitochondria: In-Silico Studies 2008; 3 (9): 1-21
18. Morin D, Hauet T, Spedding M, Tillementa JP. Mitochondria as target for antiischemic drugs *Advanced Drug Delivery Reviews* 2001;(49): 151–174
19. Korthuis R, Gute D. Adhesion molecule expression in postischemic microvascular dysfunction: activity of a micronized purified flavonoid fraction. *J Vasc Res* 1999;36:15-23
20. Gute D C, Ishida T, Yarimizu K, Korthuis R J. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle *Molecular and Cellular Biochemistry* 1998; 179: 169–187
21. Maxwell S R J, Lip G Y H. Reperfusion injury: a review of the pathophysiology, clinical manifestations and therapeutic options. *Int. J. Cardiology* 1997;58: 95-117
22. Korthuis RJ, Granger DN, Townsley MI, Taylor AE. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circulation Research* 1985;57(4) 599-605
23. Saba D, Yavuz H, Şenkaya I, Ağrıç M, Dirican M, Serdar Z, Öztürk H, Özer H, Özkan H. Kalsiyum dobesilatın iskelet kası iskemi reperfüzyon hasarındaki rolü. *Turkish J Thorac and Cardiovasc Surg* 2000;8:797-801
24. Çavdar C, Sifil A, Çamsarı T. Reaktif oksijen partikülleri ve antioksidan savunma. *Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi* 1997;3-4.92-95
25. Karahalil B, Polat S, Senkoğlu A, Bölükbas S. Evaluation of DNA damage after tourniquet-induced ischaemia/reperfusion injury during lower extremity surgery *Injury. Int. J. Care Injured* 2010;41: 758–762

26. Jackson M J, Pye D, Palomero J. The production of reactive oxygen and nitrogen species by skeletal muscle. *J Appl Physiol* 2007 ;102:1664-1670
27. Yavaş D, Zengin M, Kaklıkaya İ, Uzun Z, Ören A, Elşin M C, Değer O, Özcan F Serbest oksijen radikal temizleyici olarak aprotininin rolü (deneysel çalışma). *GKD Cer. Derg.* 1994; 2:208-215
28. Dolores D. Mruk, Bruno Silvestrini, Meng-yun Mo, C. Yan Cheng. Antioxidant superoxide dismutase - a review: its function, regulation in the testis, and role in male fertility. *Contraception* 2002 (65); 305–311
29. Zimiani K.Guarnier F.Miranda H. Watanabe M.Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide* 2005; 13:196–203
30. Pham-Huy L A, He H, Pham-Huy C. Free Radicals, Antioxidants in disease and health *Int J Biomed Sci* 2008;4(2): 89-96
31. Crinnion J N, Homer-Vanniasinkam S, Parkın S M, Gough M J. Role of neutrophil-endothelial adhesion in skeletal muscle reperfusion injury. *Brit J Surg.* 1996; 83: 251-254
32. He P. Leucocyte/endothelium interactions and microvessel permeability: Coupled or uncoupled? *Cardiovascular Research* 2010; 87: 281–290
33. Xu Y, Huo Y, Toufektsian M, Ramos S I, Ma Y, Tejani A.D, Brent A. Activated platelets contribute importantly to myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006; 290: H692- 699
34. Granger D N, Kubes P. The Microcirculation and inflammation: Modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J. Leukocyte Biology* 1994;55:662-675
35. Sacks T, Moldow C F, Craddock P R, Bowers T K, Jacob H S. Oxygen radicals mediate endothelial cell damage by complement-stimulated granulocytes an invitro model of immune vascular damage. *The American Society for Clinical Investigation* 1978; 1161-1167
36. Sengelov H, Kjeldsen L, Diamond M S, Springer T A, Borregaard N. Subcellular localization and dynamics of Mac-1 (amfi2) in human neutrophils *The American Society for Clinical Investigation* 1993; 92 :1467-1476

37. Karol A. Kaminski, Tomasz A. Bonda, Janusz Korecki, Włodzimierz J. Musiał. Oxidative stress and neutrophil activation—the two keystones of ischemia / reperfusion injury. *International J. Cardiology* 2002; 86: 41–59
38. Serizawa A. Nakamura S. Suzuki S. Baba S. Nakano M. Involvement of platelet-activating factor in cytokine production and neutrophil activation after hepatic ischemia-reperfusion. *Hepatology* 1996;23:1656-1662
39. De Silva R. Dunning J. Trull A. Vuylsteke A. A review of ischaemia-reperfusion injury in the cardiorespiratory system. *Annals of Cardiac Anaesthesia* 2003; 6: 126–131
40. Rodrigues S F, Granger D N. Role of blood cells in ischaemia–reperfusion induced endothelial barrier failure. *Cardiovascular Research* 2010; 87: 291–299
41. Gillani S. Cao J. Suzuki T. Hak D J. The effect of ischemia reperfusion injury on skeletal muscle Injury. *Int. J. Care Injured* 2011; 45:90-6:1-6
42. Lefter A M, Lefter D J. The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovascular Research* 1996;32: 743-751
43. Wink D. Mitchell J. Chemical Biology of Nitric Oxide: Insights into regulatory, cytotoxic, and cytoprotective mechanisms of nitric oxide. *Free Radical Biology & Medicine* 1998; 25: 434–456
44. Becker L. New concepts in reactive oxygen species and cardiovascular reperfusion physiology. *Cardiovascular Research* 2004; 61: 461–470
45. Ekim H, Erdoğan B. Kutay V. Başel H. Özen S. Hazar A. Akbayrak H. Abdominal aortaya kros klemp konmasının neden olduğu iskemi/reperfüzyon hasarının akciğerlere etkisi. *Van Tıp Dergisi* 2005;12 (3):175-178
46. Uysal A, Burma O, Akar İ, Özsin K K, Rahman A, Üstündağ B, Özercan H İ. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonunun yol açtığı akciğer hasarında melatoninin koruyucu etkinliği. *Turkish J Thorac Cardiovasc Surg* 2006;14(4): 308-314
47. Tekeli A, Akgün S, Civelek A, İşbir S, Ak K, Demirtaş G, Şirvancı S, Arbak S, Yaylım İ, Çobanoğlu A. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyonu sonucunda

- gelişen akciğer hasarının incelenmesinde farklı bir ajan:FK 506 (Takrolimus). Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2001; 9:242-246
48. Silva A. Ramalho F. Ramalho L. Lopes M. Jordão A. Vanucchi H. Piccinato C. Zucoloto S. Effect of NFκB inhibition by CAPE on skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. J. Surg. Res. 2009; 153: 254–262
49. Pattwell D. Ashton T. McArdle A. Griffiths R. Jackson M. Ischemia and reperfusion of skeletal muscle lead to the appearance of a stable lipid free radical in the circulation. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 284: H2400–H2404
50. Kaplan Ş, Kiriş İ, Kılbaş A, Altuntaş İ, Karahan N, Okutan H. Eritropoietinin sıçan aortik iskemi-reperfüzyonunda akciğer hasarı üzerine etkisi. Turkish J Thorac Cardiovasc Surg. 2009;17:110-116
51. Staub N. Schultz E. Albertine K. Leucocytes and pulmonary microvascular injury. Annals New York Academy of Sciences 1982;077-8923:332-343
52. Alaçam B. Ek R. Yıldız Y. Serter M. Boylu N. Temoçin S. Abdominal aorta iskemi-reperfüzyonuna bağlı gelişen akciğer hasarında karnozinin etkisi. ADÜ Tıp Fakültesi Dergisi 2010; 11(3) : 41 – 47
53. İşbir S. Akgün S. Ak K. Zeybek Ü. Aydın M. Civelek A. Tekeli A. Çobanoğlu A. Akut alt ekstremitte iskemi/reperfüzyon hasarının akciğer serbest oksijen radikalleri üzerine olan etkisi. TGKDCD 2000; 8:2, 629-31
54. Berkan Ö, Yıldız E, Güneç F, Katrancıoğlu N, Günay İ, Doğan K. İskemi ve reperfüzyona bağlı olarak ortaya çıkan akciğer hasarını önlemede pentoksifilin, karnitin ve askorbik asidin etkileri. Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2002;10:91-94
55. Berkan Ö, Yıldız E, Katrancıoğlu N, Günay Ü. Alt ekstremitte iskemi reperfüzyona bağlı gelişen akciğer hasarında askorbik asidin etkisi. Turkish J Thorac Cardiovasc Surg 2001;9: 238-241
56. Seekamp A, Warren J S, Remick D G, Till G O, Ward P A. Requirements for Tumor Necrosis Factor-α and Interleukin-1 in Limb Ischemia/Reperfusion Injury and Associated Lung Injury. American J. Pathology 1993;143(2): 453-463

57. Roumen R M.H, Hendriks T, Ven-Jongekrijg J V D, Nieuwenhuijzen G A. P, Robert W. Sauerwein, Meer J W. M, R. Jan A. Goris. Cytokine patterns in patients after major vascular surgery, hemorrhagic shock, and severe blunt trauma relation with subsequent adult respiratory distress syndrome and multiple organ failure. *Annals of Surg.* 1993; Vol. 218, No. 6, 769-776
58. Tzoulaki I, Gordon D. Murray, Amanda J. Lee, Ann Rumley, Gordon D.O. Lowe and F. Gerald R. C-Reactive Protein, Interleukin-6, and soluble adhesion molecules as predictors of progressive peripheral atherosclerosis in the general population study. *Circulation* 2005;112:976-983
59. Gregory C. Gaines, M. Burrell Welborn III, Lyle L. Moldawer, Thomas S. Huber, Timothy R. S. Harward, Seeger J M, Gainesville, Fla. Attenuation of skeletal muscle ischemia/reperfusion injury by inhibition of tumor necrosis factor. *Journal of Vascular Surgery* 1999; Volume 29, Number 2; 370-376
60. Kima H J, Tsoya I, Parka J M, Chungb J, Shinc S C, Changa K C. Anthocyanins from soybean seed coat inhibit the expression of TNF- α -induced genes associated with ischemia/reperfusion in endothelial cell by NF- κ B-dependent pathway and reduce rat myocardial damages incurred by ischemia and reperfusion in vivo. *FEBS Letters* 580 (2006) 1391–1397
61. Tassiopoulos A K, Carlin R E, Gao Y, Pedoto A, Finck C M, Lands S K, Tice D G, Marx W, Hakim T S, McGraw D J. Role of nitric oxide and tumor necrosis factor on lung injury caused by ischemia/reperfusion of the lower extremities. *J Vasc Surg* 1997;26: 647-656
62. Cao G.Prior L. Comparison of different analytical methods for assessing total antioxidant capacity of human serum. *Clinical Chemistry* 1998; 44:6;1309–1315
63. Sağsöz N, Kısa Ü, Apan A. Ischaemia–reperfusion injury of rat ovary and the effects of vitamin C, mannitol and verapamil. *Human Reproduction* 2002;17,(11):2972–297
64. Günel E, Çağlayan F, Çağlayan, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents. *J Pediatr Surg* 1998;33:1536-1539

65. M Larsen, G Webb, S Kennington, N Kelleher, J Sheppard, J Kuo and J Unsworth-White. Mannitol in cardioplegia as an oxygen free radical scavenger measured by malondialdehyde Perfusion 2002;17: 51
66. Weinbroum A. Mannitol prevents acute lung injury after pancreas ischemia-reperfusion: A dose-response, ex vivo study. Lung 2009; 187:215–224
67. Yoshida B.Campos E. Ischemia and reperfusion in skin flaps: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. Acta Cirúrgica Brasileira 2005; 20 (5) : 358-363
68. Engin A, Şahin T T, Kurukahvecioğlu O, Sepici-Dinçel A. Farklı şiddetteki cerrahi travmalara erken yanıtta serum albumin ve homosisteininin önemi. Turkish J. Biochemistry 2010; 35 (2) : 77–82
69. Quinlan G.Martin S. Evans T. Albumin: biochemical properties and therapeutic potential. Hepatology 2005; 41(6):1211-1219
70. Anraku M, Yamasaki K, Maruyama T, Kragh-Hansen U, Otagiri M. Effect of Oxidative stress on the structure and function of human serum albumin Pharmaceutical Res. 2001; Vol. 18, No. 5: 632-639
71. Roche M.Rondeau F.Singh N.Tarnus E.Bourdon E. The antioxidant properties of serum albumin. Federation of European Biochemical Societies 2008;582:1783-1787
72. Yurteri H, Oktay İ,Sulayan Ü, Ermutlu E.Hemodiyaliz hastalarında düzenli düşük doz human albumin kullanımının değerlendirilmesi. Türk Nefroloji Diyaliz ve Transplantasyon Dergisi 1996; 31-33
73. Ishima Y.Akaike T.Kragh-Hansen U.Hiroyama S.Sawa T.Maruyama T.Kai T.Otagiri M. Effects of endogenous ligands on the biological role of human serum albumin in S-nitrosylation. Biochemical and Biophysical Res. Communications 2007; 364:790–795
74. Bourdon E, Loreau N, Blache D. Glucose and free radicals impair the antioxidant properties of serum albumin. The FASEB Journal 1999; Vol. 13: 233-244
75. Toom R.Jong M.Krenning E.Hoek H.Kate W.Hennemann G.Terpstra O. Euro-Collins Solution Versus UW-Solution For Long Term Liver

- Preservation İn The İsolated Rat-Liver Perfusion Model.HPB Surgery 1991;4:313-320
76. Yalın A. Keskinöz E. Kızaran A. Organ korunması. Acıbadem Ünv. Sağlık Bilimleri Dergisi 2011;1:1-4
77. Okada Y. Kondo T. İmpact of lung preservation solutions, Euro-Collins vs. low-potassium dextran, on early graft function: A review of five clinical studies. Ann Thorac Cardiovasc. Surg. 2006;12:10-14
78. Sipavicius R. Graziene V. Zurauskas E. Salkus G. Laurinavicius A. Misevicius K.5, Dukstaite A. Sirvydis V. Preservation quality assesment of low potassium Euro-Collins And standard Euro-Collins Solution in a canine single-lung transplant model. Seminars in Cardiology 2003;9:49-52
79. Cunha M. Silva F. Nakamoto H. Ferreira M. Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase. Clinics 2005;60:213-220
80. Akın S. Özcan M. Postischemic flap washout with hydroxyethyl starch (HAES) and its beneficial effect on the no-reflow phenomenon in rat skin island flaps. Eur J Plast Surg 1998; 21: 238-242
81. Tsuchida T. Kato T. Yamaga M. Ikebe K. Oniki Y. Irie H. Takagi K. Effect of perfusion during ischemia on skeletal muscle. J. Surg. Res. 2001; 101:238–241
82. Berkan Ö. Aksoy M. Çetinkaya Ö. Tiliğ Y. Manduz Ş. Doğan K. Günay İ. İskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasında pentoksifilin sialik asit üzerine olan etkisi. Türk Göğüs Kalp Damar Cer Derg 2001;9:42-45
83. Teruya R. Fagundes D. Oshima C. Brasileiro I. J. Marks G. Ynouye C. Simoes M. The effects of pentoxifylline into the kidneys of rats in a model of unilateral hindlimb ischemia/reperfusion injury. Acta Cirúrgica Brasileira 2008; 23:28-35
84. Yassin M. Harkin D. Barros D'Sa A. Halliday M. Rowlands B. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. World J. Surg. 2002; 26:115–121

85. Ege A. Turhan E. Bektaş S. Pamuk K. Bayar A. Keser S. İskelet kası iskemi-reperfüzyon hasarının hangi evresinde lokal soğuk uygulaması daha etkilidir?. *Acta Orthop Traumatol Turc* 2008;42(3):193-200
86. Weinbroum A. Shapira I. Abraham R B. Szold A. Mannitol dose-dependently attenuates lung reperfusion injury following liver ischemia reperfusion: A dose-response study in an isolated perfused double-organ model. *Lung* 2003; 180:327–338
87. Khoury W, Namnesnikov M, Fedorov D, Abu-Ghazala S, Weinbroum A A, Mannitol attenuates kidney damage induced by xanthine oxidase-associated pancreas ischemia-reperfusion. *J. Surg. Research* 2010;160:163–168
88. Kostopanagiotou G. Pandazi A. Andreadou İ. Markantonis S. Niokou D. Teloudis A. Costopanagiotou C. Arkadopoulos N. Smyrniotis V. Effects of mannitol in the prevention of lipid peroxidation during liver resection with hepatic vascular exclusion. *J. Clinical Anesthesia* 2006;18: 570–574
89. Süzer Ö. Köseoğlu S. Özüner Z. Human Albumin Enriched ST. Thomas Hospital Cardioplegic Solution increases reperfusion injury in isolated perfused rat hearts. *Pharmacological Res.* 1998;. 37:97-101

