TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ

RAT FLEP İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE UZAK İSKEMİK ÖN KOŞULLANMA VE UZAK İSKEMİK ÖN KOŞULLANMAYA EKLENEN ADENOZİN'İN ETKİNLİĞİNİN ARAŞTIRILMASI

Dr. Zeynep TUZLALI

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF VE ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

DANIŞMAN
PROF. DR. SAVAŞ SEREL

ANKARA
2017

KABUL VE ONAY

ANKARA ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
TEZ SINAVI TUTANAĞI

I. UZMANLIK ÖĞRENCİSİNİN		
Adı, Soyadı	: Zeynep TUZLALI	**Sınav tarihi:** 08 / 11 / 2017
Anabilim/Bilim Dalı	: Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.	
Tez Danışmanı	: Prof. Dr. Savaş SEREL	

II. TEZ İLE İLGİLİ BİLGİLER			
Tezin Başlığı: Rat Flep İskemi Reperfüzyon Modelinde Uzak İskemik Ön Koşullanma ve Uzak İskemik Ön Koşullanmaya Eklenen Adenozin'in Etkinliğinin Araştırılması			
Tezin Niteliği:	☒ Ana Dal Uzmanlık Tezi	☐ Yan Dal Uzmanlık Tezi	
Kaçıncı tez sınavı olduğu:	☒ 1	☐ 2	☐ 3

III. KARAR

Yapılan tez sınavı sonucunda yukarıda belirtilen tezin "Tıpta Uzmanlık Tezi" olarak

☒ Kabulüne

☐ Reddine

☐ Düzeltmeler yapıldıktan sonra tekrar değerlendirilmesine

☒ Oy birliği ☐ Oy çokluğu ile karar verilmiştir.

IV. AÇIKLAMALAR

Lütfen, tezin reddi veya düzeltme istenmesi durumunda gerekçeli açıklamalarınızı buraya yazınız

Jüri Başkanı
Prof. Dr. Serdar Mehmet GÜLTAN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik,
Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Jüri Üyesi
Prof. Dr. Savaş SEREL

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik,
Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

Jüri Üyesi
Doç. Dr. Çağrı UYSAL

Başkent Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik,
Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi A.D.

ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalında asistanlığım boyunca eğitimimde çok büyük emekleri olan hocalarım Prof. Dr. Serdar Mehmet GÜLTAN, Prof. Dr. Mustafa Rıza ÖZBEK, Prof. Dr. Zeki CAN, Prof. Dr. Kutlu SEVİN, Prof. Dr. Murat EMİROĞLU'na çok teşekkür ederim.

Sayın hocalarım ve sevgili abilerim Prof. Dr. Savaş SEREL'e ve Doç. Dr. Burak KAYA'ya uzmanlık eğitimim boyunca gösterdiği emeklerinden dolayı ve her anlamda yol gösterici olmalarından dolayı ayrıca çok teşekkür ederim.

Uzmanlık eğitimim süresince beraber çalışmaktan keyif aldığım asistan arkadaşlarım, hemşireler, sekreterler ve personellere teşekkür ederim.

Ayrıca bu tezin oluşmasında büyük yardım ve emeği olan Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Aylin OKÇU HEPER'e, Uzm. Dr. Cevriye CANSIZ'a, Biyoistatistik Anabilim Dalı'nda görevli Doç. Dr. Serdal Kenan KÖSE'ye, Fizyopatoloji Bilim Dalı'nda görevli Prof. Dr. Nuray YAZIHAN'a ve Vet. Hek. Atilla İŞGÖREN'e teşekkürlerimi sunarım.

Maddi ve manevi olarak bu seviyeye gelmemde çok büyük emeği olan aileme teşekkür ederim.

Hayattaki en büyük şansım olan eşim Dr. Hakan TUZLALI'ya yardımları, desteği ve sabrı için sonsuz teşekkür ederim.

Dr. Zeynep TUZLALI
ANKARA- 2017

İÇİNDEKİLER

Safya No

KABUL VE ONAY i
ÖNSÖZ VE TEŞEKKÜR ii
İÇİNDEKİLER iii
KISALTMALAR DİZİNİ v
ŞEKİLLER DİZİNİ vi
TABLOLAR DİZİNİ vii
GRAFİKLER DİZİNİ viii
1. GİRİŞ 1
2. GENEL BİLGİLER 2
2.1. Flep Fizyolojisi 2
2.2. Flep Kaybı ve İskemi Reperfüzyon Hasarı 3
2.3. Ön Koşullanma Yöntemleri 10
2.4. Adenozin ve Etki Mekanizması 13
3. GEREÇ VE YÖNTEM 17
3.1. Deney Hayvanları 17
3.2. Gereçler 17
3.3. Yöntem 19
3.3.1. Çalışma Grupları 19
3.3.2. Cerrahi Teknik 20
3.4. Değerlendirme Yöntemleri 24
3.4.1. Biyokimyasal İnceleme 24
3.4.2. Histopatolojik Değerlendirme 25
3.4.3. İstatistiksel Değerlendirme 26
4. BULGULAR 27
4.1. Biyokimyasal Bulgular 27
4.2. Histopatolojik Bulgular 31
5. TARTIŞMA 36
6. SONUÇLAR 42
ÖZET 43

SUMMARY 44
KAYNAKLAR 45

KISALTMALAR DİZİNİ

AMP : Adenozin monofosfat

ATP : Adenozin trifosfat

DAG : Diaçilgliserol

GSH-Px : Glutatyon peroksidaz

GST : Glutatyon S-Transferaz

H-E : Hematoksilen Eozin

H_2O_2 : Hidrojen peroksit

OH^- : Hidroksil iyonu

İL-1 : İnterlökin-1

İL-3 : İnterlökin-3

İL-8 : İnterlökin-8

İRH : İskemi reperfüzyon hasarı

İÖK : İskemik ön koşullanma

KAT : Katalaz

KDH : Ksantin dehidrojenaz

KO : Ksantin oksidaz

LDH : Laktat dehidrogenaz

NADP : Nikotinamid adenin dinükleotit fosfat

NAD^+ : Nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu

NO : Nitrik oksit

PLC : Fosfolipaz C

PLD : Fosfolipaz D

PKC : Protein kinaz C

PMNL : Polimorf nüveli lökosit

SOR : Serbest oksijen radikali

SOD : Süperoksit dismutaz

TNF : Tümör nekroz faktör

UİÖK : Uzak iskemik ön koşullanma

TAK : Total antioksidan kapasite

TOS : Total oksidan stres

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa No

Şekil 2.1: İskemiye bağlı gelişen hücre içi değişimler..... 7
Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan preparat 18
Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan anestezik ilaçlar..... 18
Şekil 3.3: Sıçan karnında 3x6 cm'lik tek taraflı inferior epigastrik flebin planlanması 21
Şekil 3.4: Flebin pedikülünün hazırlanması, flebin elevasyonu 22
Şekil 3.5: Flebin pedikülüne mikroklemp konarak iskemi sağlandı..... 23
Şekil 3.6: Uzak iskemik ön koşullanma modeli..... 24
Şekil 4.1: Sham grubuna ait örnek, (H&E x20). 33
Şekil 4.2: İskemi reperfüzyon kontrol grubundan alınan kesite ait lamina propriada yoğun PMNL infiltrasyonu, (H&E x400, ok; PMNL infiltrasyonu)..... 34
Şekil 4.3: Uzak iskemik ön koşullanma+ iskemi reperfüzyon grubundan alınan kesite ait lamina propriada hafif PMNL infiltrasyonu, (H&E x100). 34
Şekil 4.4: Uzak iskemik ön koşullanma+ adenozin+ iskemi reperfüzyon grubundan alınan kesite ait lamina propriada hafif PMNL infiltrasyonu, (H&E x100). 35
Şekil 4.5: Uzak iskemik ön koşullanma+ adenozin+ iskemi reperfüzyon grubundan alınan kesite ait lamina propriada hafif PMNL infiltrasyonu, (H&E x200). 35

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa No

Tablo 2.1: Endojen ve eksojen antioksidanlar 9
Tablo 2.2: İskemik ön koşullanmada salınan mediatörler 12
Tablo 2.3: Adenozin reseptörleri ve etki mekanizmaları 15
Tablo 3.1: Çalışma grupları 19
Tablo 3.2: Histolojik değerlendirmeler yapılırken kullanılan skorlama sistemi 26
Tablo 4.1: Gruplarda TAK değerleri 27
Tablo 4.2: Gruplarda TOS değerleri 28
Tablo 4.3: Gruplarda TNF-alfa değerleri 28
Tablo 4.4: Gruplarda IL-8 değerleri 28
Tablo 4.5: Biyokimyasal verilerin istatiksel olarak karşılaştırılması 29
Tablo 4.6: Histopatolojik verilerin istatiksel olarak karşılaştırılması 32

GRAFİKLER DİZİNİ

Sayfa No

Grafik 4.1: Total antioksidan kapasite değerlerinin gruplara göre dağılımı 30
Grafik 4.2: Total oksidan stres değerlerinin gruplara göre dağılımı..... 30
Grafik 4.3: TNF-alfa değerlerinin gruplara göre dağılımı 31
Grafik 4.4: IL-8 değerlerinin gruplara göre dağılımı..... 31
Grafik 4.5: PMNL değerlerinin gruplara göre dağılımı..... 32
Grafik 4.6: Ödem yoğunluğunun gruplara göre dağılımı 33

1. GİRİŞ

Doğumsal veya edinsel defektlerin uygun form ve fonksiyon ile onarımı plastik cerrahinin temel uğraş alanıdır. Flepler ise yüzyıllardır bu amaçla kullanılmaktadır. Artan çalışmalar ile flep fizyolojisinde bir çok etken tanımlanmasına rağmen, halen flep nekrozu rekonstrüktif cerrahi için sorun teşkil etmektedir. Deneyimli cerrahların yaptığı serbest fleplerde total flep kaybı %1-5 arasındadır. Kısmı flep kaybı serbest fleplerde %7-20, pediküllü fleplerde %20-33 arasındadır. Bu komplikasyonların oluşmasında iskemi sonrası oluşan reperfüzyon hasarı büyük rol oynamaktadır. Rekonstrüktif cerrahide flep sağkalımı ile; hasta seçimi, cerrahi teknik ve iskemi süresi doğrudan ilişkilidir. İskemi özellikle mikrovasküler cerrahide ve replantasyonlarda oldukça önemlidir (1). Flep yaşayabilirliğinde önemli bir problem olan iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesine yönelik günümüzde bir çok yöntem denenmektedir. Bunlardan bazıları iskemik ön koşullanma, uzak iskemik ön koşullanma ve farmakolojik ön koşullanmadır (2). Temel olarak iskemik ön koşullanma, kısa iskemik epizodları izleyen reperfüzyon periyodları ile sonraki uzun süreli iskemiye doku direncini arttıran süreçtir (3). Uzak ön koşullanma ise bir organa uygulanan iskemik ön koşullanmanın başka bir dokunun iskemiye olan direncini arttırmak için yapılmaktadır (4).

Adenozin doğal bir nükleozid olup vücudumuzda bir çok fizyolojik olayda sentezlenip kullanılmaktadır (5). İskemi, hipoksi ve travma gibi durumlarda üretimi artar ve önemli bir lokal düzenleyici görev üstlenir. Yaptığı vazodilatasyon ile dokuda iskemiye bağlı oluşacak hasara karşı koruyucudur (6). Gündelik hayatta adenozin kardiyolojide ritm düzenlemek amacıyla kullanılmaktadır. Ancak güçlü bir antioksidan özelliği vardır ve özellikle karaciğer, kalp, kas ve beyin iskemi reperfüzyonundaki koruyucu etkisini gösteren bir çok çalışma yapılmıştır (6, 7, 8, 9).

Bu çalışmada klinikte karşılaşılan ve önemli bir sorun olan iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi amacıyla uzak iskemik ön koşullanmanın ve uzak iskemik ön koşullanmanın adenozin ile birlikteliğinin etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flep Fizyolojisi

Flep donör alandan alıcı alana transfer edilirken kendi kanlanmasını sürdüren doku parçasıdır. Bir flebin yaşabilirliği büyük ölçüde kan akımına bağlıdır. Bu kan akımı sistemik ve lokal faktörler tarafından sağlanmaktadır (10).

Flep kan akımı makrodolaşım ve mikrodolaşım komponentlerinden oluşmaktadır. Kan akımını ve flep yaşayabilirliğini dolayısıyla bu iki dolaşımı etkileyen intrinsik ve ekstrinsik bir çok faktör mevcuttur. Makrodolaşım bir flebin tanımlanması ve dizayn edilmesinde kullanılırken, mikrodolaşım ile flebin oksijenlenmesi, oluşan karbondioksit ve hücresel düzeydeki artıkların uzaklaştırılması yani hücresel düzeydeki metabolik olayların düzenlenmesi sağlanır. Mikrodolaşım kan akımının kontrolunun büyük ölçüde sağlandığı arteriyol, venül, kapiller ve arteriovenöz anastomozlardan oluşmaktadır (11).

Derinin birincil fonksiyonu vücut sıcaklığının düzenlenmesi olup bu kan akımı ile sağlanır. Deri sıcaklığı kan akımı arttırılarak dağıtılırken, kan akımı azaltılarak korunmaktadır. Bu kan akımının düzenlendiği nokta ise arteriyollerdir. Arteriyollerde, prekapiller sfinkterlerde ve arteriyovenöz anastomozlarda sempatik sistem aracılığıyla kan akımı düzenlenir. Sempatik etkilerle prekapiller sfinkter kasıldığında kan akımı kapiller yatak yerine arteriyovenöz anastomozlara doğru yönlendirilir (11).

Normal deri kan akımı yaklaşık olarak 100 gr başına 20 ml'dir, dikkat çekici ölçüde kas dokusunun kan dolaşımı daha fazladır (12). Farklı dokuların metabolik ihtiyaçları ve kan akımı doğru orantılır. Flep yaşayabilirliği ise kan akımı ve metabolik ihtiyaçlar arasındaki kritik dengeye bağlıdır. Bu nedenle flepler tasarlanırken bu kritik dengenin akılda tutulması oldukça önemlidir (11).

Sistemik dolaşım nöral ve humoral mekanizmalar ile düzenlenir (10). Bu mekanizmalardan baskın olanı nöral mekanizmadır ve adrenerjik reseptörleri ile vazokonstriksiyon ve beta adrenerjik reseptörleri ile vazodilatasyon yapan sempatik sinir sistemi primer olarak kullanılmaktadır. Ayrıca arteriyovenöz anastomozlarda yer alan serotonerjik reseptörler de vazokonstriksiyona neden olmaktadır. Tüm bu mekanizmalar birlikte arteriyol ve arteriyovenöz anastomozlardaki düz kas tonusunu düzenler (11).

Humoral regülasyon da epinefrin ve norepinefrinin alfa adrenerjik reseptörler ile etki etmesi gibi, sistemik vazoaktif maddelerin kendi spesifik reseptörleri üzerine etki etmesi ile gerçekleşir. Sistemik vazokonstriktif ajanlar arasında serotonin, tromboksan A_2 ve prostoglandin $F_{2\alpha}$ yer alırken, vazodilatatörler arasında prostaglandin E_1, prostaglandin I_2, histamin, bradikinin ve lökotrien C_4 ve D_4 yer alır (11).

Kan akımının lokal kontrolü özellikle metabolizması hızlı olan iskelet kası gibi dokular için oldukça önemlidir. Lokal seviyede kan kontrolünü düzenleyen metabolik olaylar hiperkapni, hipoksi ve asidozdur. Tüm bu etkenler vazodilatasyona neden olmaktadır. Ayrıca artmış doku basıncı sistemik basınçtan bağımsız olarak kapiller düzeydeki kan akımının belirli seviyede tutmak için miyojenik refleksi tetikler ve vazokonstriksiyona neden olur. Lokal hipotermi de doğrudan damar düz kasına etki ederek vazokonstriksiyona neden olurken lokal hipertermi tam tersi etki oluşturur (11).

Reolojik faktörler ise tipik olarak anormal durumlarda kan akımına etkilidir. Aneminin flep kan akımını ve distal flep yaşayabilirliğini arttırdığını gösteren çalışmalar mevcuttur (13).

Flep cerrahisi sırasında flebin kaldırılması doku ve kan akımı arasındaki dengeyi bozan önemli değişikliklere neden olmaktadır. Sempatik liflerin kesilmesi sonrası vazokonstriktör nörotransmitter deşarjı olur (14). Perfüzyonun besleyici arterden kesilmesi ile flebin periferik kısımları iskemik olur ve bu periferik kısımların mikrodolaşımında ilk 24 saat içinde meydana gelen değişimler flebin hangi kısımlarının sağkalacağını belirler. Banbury ve arkadaşları bu süreçte mikrodolaşımda dinamik, trifazik cevapların meydana geldiğini bildirmişlerdir. Çalışmaya göre başlangıçta akut hiperadrenerjik faz, ikincil olarak vazodilatasyonun belirgin olduğu faz ve en son olarak da vazoaktif maddelere aşırı duyarlılık fazları olmakta ve kapiller akım artmaktadır (15). Flep kaldırıldığında flep distalinde ilk 6-12 saatte kan akımı normalin %20'sinin altına düşmekte ve %100'üne ancak 3 ila 4. haftalarda ulaşmaktadır (11).

2.2. Flep Kaybı ve İskemi Reperfüzyon Hasarı

Flep cerrahisinde son yıllarda keşfedilen önemli yeniliklere rağmen hala iskemi reperfüzyon hasarına (İRH) bağlı flep kaybı önemli bir sorundur ve parsiyel flep

kaybının altında yatan temel nedendir (16). İskemi reperfüzyon hasarının nedenlerinin bilinmesi bu hasarın olası etkilerinden korunmak açısından oldukça önemlidir. İskemi bir dokuya gelen yetersiz kan akımıdır (17). Dokunun toleransını aşan bir iskemi sonrası önce inflamasyon sonra nekroz kaçınılmaz olacaktır (18). Reperfüzyonun ardından dokuya iskemiden daha fazla zarar verecek bir dizi patofizyolojik olaylar kaskatı başlayacaktır. İskemi reperfüzyon hasarının etkilerini bir çok farklı organda inceleyen çalışmalar yapılmıştır (19). Çünkü iskemi reperfüzyon hasarı hastalarda artmış morbiditeye, uzamış hastanede yatış süresine ve maliyetin artmasına neden olan önemli bir faktördür (18). Ayrıca iskemi reperfüzyon hasarı organ transplantasyonlarında akut ve kronik rejeksiyonların da önemli bir nedenidir (20). Rekonstrüktif cerrahide serbest flepler transplantasyon için özel bir grubu oluşturur, çünkü rejeksiyona neden olan immunolojik faktörler olmadığı için iskemi reperfüzyon hasarını göstermek amacıyla ideal modellerdir (16).

Flep cerrahisinde serbest flepler aktarılırken her zaman ve önlenemez bir şekilde iskemi reperfüzyon hasarı meydana gelmektedir. Buna primer iskemi adı verilmektedir. Bu evreden sonra oluşan her türlü iskemi ise sekonder iskemi adını almaktadır ve en sık nedeni yetersiz cerrahi tekniktir (16). Sekonder iskemi flebin çok geniş tasarlandığı, distal iskeminin görüldüğü durumlar ve anastomozdaki başarısızlığa bağlı iskeminin görüldüğü durumlar olarak ikiye ayrılmaktadır (1). Anastomozdaki başarısızlığın ise en sık nedeni trombozlardır. Diğer nedenler ise alıcı damarın iyi seçilmemiş olması, alıcı ve donör damarlarda daha önce ateroskleroz gibi patolojik bir durumun olması ve hipotansiyon gibi sistemik problemlerdir (18). Yine anastomozu baskıya uğratacak hematom, damarın katlanması, aşırı gergin kapatma veya drenin baskısı gibi nedenler de anastomoz başarısızlığına neden olmaktadır (18).

Arteriyel ve venöz tıkanıklığın her ikisi de flep yaşabilirliğini etkilese de venöz tıkanıklık daha sıklıkla görülmekte ve arteriyel tıkanıklıktan daha fazla olarak dokuya zarar vermektedir (1).

İskemi süresinin uzunluğu doku hasarı ile direkt olarak ilişkilidir. İskemiye maruz kalan bir dokuda ortamda yeterli oksijen bulunmadığından hücresel düzeyde anaerobik yollar aktifleşir. Kritik iskemi zamanı, flebin tamamen iskemiyi tolere edebileceği ve yaşamayı sürdüreceği maksimum zaman olarak tanımlanmıştır. Kritik iskemi zamanını aşan bir iskemide nekroz kaçınılmaz olacaktır (21).

Hayvan çalışmaları cilt fleplerinin sekonder iskemiye primer iskemiden daha az dayanıklı olduğunu göstermiştir (22). Ancak mikrocerrahide cerrahın daha deneyimli olması dışında sekonder iskemiyi engelleyecek herhangi bir yöntem bulunmamaktadır. Bu nedenle flep kaybını önlemek amacıyla iskemi reperfüzyon hasarının azaltılması oldukça önem taşımaktadır.

İskemi süresince ve özellikle reperfüzyon başladığında reaktif oksijen radikali adı verilen metabolitler oluşur (23). Reaktif oksijen radikallerinin oluşması endotel hücrelerinin şişmesi, vazokonstrüksiyon ve artmış kapiller geçirgenlik gibi mikrodolaşımı bozan bir çok olayın nedenidir (16).

Cilt fleplerinde özellikle ksantin oksidaz sistemi üzerinden üretilen reaktif oksijen radikalleri önem taşımaktadır (24). 1985 yılında ratlarda yapılan bir çalışmada ksantin oksidaz sistemini inhibe eden bir ajan olan allopurinolun sistemik kullanımı sonrasında reaktif oksijen radikallerinde azalma ve flep yaşabilirliğinde artış gösterilmiştir (25).

Antioksidanlar reaktif oksijen radikallerini nötralize ederek doku zararını engellerler. Glutatyon, ürik asid, adenozin gibi vücutta üretilen endojen antioksidanlar ve diyetle alınan eksojen bir çok antioksidan ve koruyucu etkileri ile ilgili bir çok çalışma yapılmıştır (26).

Reaktif oksijen radikallerinin artması ve azalmış antioksidan savunması oksidatif stres adını almaktadır (27). Eğer ortamda reaktif oksijen radikallerinden daha fazla antioksidan bulursa dokular oksidatif stresten korunacak ve dokuda hasar azalacaktır. Literatürde antioksidanların iskemi reperfüzyondan önce veya olay sırasında verilmesi ile uzun dönemde bile organ fonksiyonlarında düzelme ve koruyucu etkinliğinin olduğunu gösteren bir çok çalışma mevcuttur (28, 29, 30, 31, 32).

İskemi reperfüzyon hasarının diğer nedenlerinden biri de masif nötrofil salınımıdır. Reaktif oksijen radikallerinin neden olduğu kemotaksi ve adezyon moleküllerinin aktifleşmesi ile dokuda nötrofil infiltrasyonu olmaktadır (16). 1998 yılında Çetinkale ve arkadaşları tarafından nötrofil infiltrasyonunu azaltma etkisi bulunan immunsupresif bir ajan verilerek flep yaşabilirliğinin arttığını gösteren bir çalışma yapılmıştır (33).

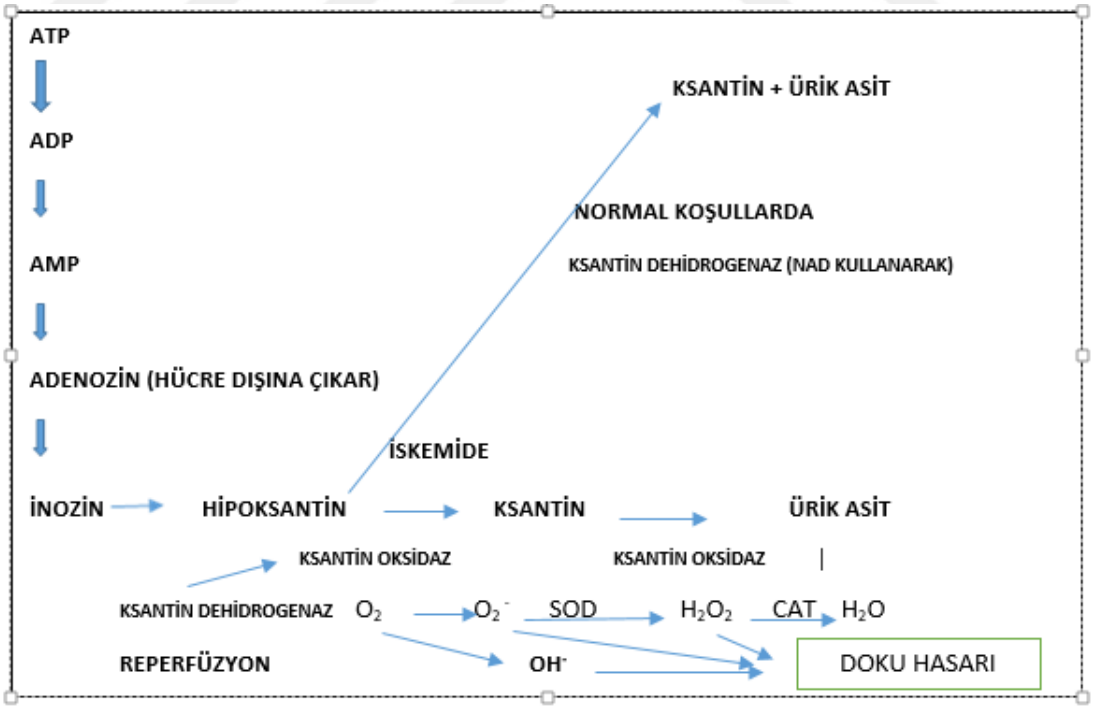
Oksidatif stres altında endotel hücrelerinden salınan nitrik oksit de iskemi reperfüzyon hasarı için oldukça önem taşımaktadır. Normalde en güçlü arteriyel vazokonstriktörlerden olan endotelinin etkisini azaltırken oksidatif stres altında tam tersi etki oluşturur. Nitrik oksit seviyesindeki azalma, iskemi reperfüzyon hasarının önemli mekanizmalarından bir diğeri olup normalde NO, dokuları trombosit adezyonunu engelleyerek, vaskuler tonusu ayarlayarak hasardan korumaktadır. L-arjininden endotel hücreleri ve nöronlardan nitrik oksit sentaz enzimi kullanılarak sentezlenen nitrik oksitin farklı çeşitleri mevcut olup bazen de iskemi reperfüzyon hasarını tetiklediği bilinmektedir (34).

Dokunun hipoksisi ve yeniden kanlanma sonrasında serbest oksijen radikallerinin (SOR) oluşması ve inflamatuar mediatörlerin salınması, İRH potasiyel mekanizmasını oluşturmaktadır (35). Süper oksit anyonu, hidrojen peroksit ve hidroksil radikali en iyi bilinen SOR türleridir. Bu ürünlerin oluşumunda nikotinamid adenin dinükleotit fosfat (NADP) sistemi ile ksantin oksidaz sistemi etkin rol oynamaktadır. İskemik bir dokunun reperfüzyonu ile oluşan hasar sadece iskemi ile oluşan hasardan paradoksal olarak çok daha ciddidir (36). Reperfüzyon hasarına en fazla duyarlı olan hücresel yapılar ise zar lipitleri ve proteinlerdir (37).

Dokuya gelen kan akımının kesilmesi veya azalması ile hücresel oksidatif fosforilasyon ve hücrede adenozin 5'-trifosfat ve fosfokreatin gibi yüksek enerjili fosfat sentezi azalır. Hücrede enerji depolarının boşalması hücre zarında bulunan Na^+-K^+-ATP_{az} pompasının inhibe olmasına neden olur. Sonuçta hücre içinde Na^+ ve Ca^{+2} iyon konsantrasyonları artar, K^+ hücre dışına çıkar ve hücre içinde Ca^{+2} iyon konsantrasyonunun artması hücre için sitotoksik etki gösterir (38). Ayrıca artan Ca^{+2} fosfolipaz, proteaz, ATPaz ve endonükleaz gibi bir çok enzimin de aktive olmasını sağlar. Bu proteazların aktivasyonu; iskemi sırasında tümör nekroz faktör (TNF), interlökin-1 (İL-1), interlökin-3 (İL-3), interlökin-8 (İL-8) nötrofillerden salınan elastaz ve kompleman sistem aktivasyonu tarafından gerçekleştirilir. İyon konsantrasyonundaki bu değişim ile hücreyi reperfüzyon hasarına karşı daha çok dayanıksız kılacak faktörler olan proinflamatuar sitokinlerin artışı gözlenir. Bu sitokinler lökosit adezyon moleküllerinin de artmasına neden olmaktadır.

İskemi döneminde adenozin trifosfat (ATP) üretimi durduğu halde kullanımı devam ettiği için ATP'den adenozin monofosfat (AMP) ve adenozin oluşur. Adenozin,

hızla hücre dışına difüze olur ve inozin ve hipoksantine parçalanır. İskemi sonrasında ATP gibi yüksek enerjili fosfat bileşiklerinin yıkımı, dokuda ksantin ve hipoksantin gibi pürin metabolitlerinin birikimine ve ksantin dehidrojenazın (KDH) ksantin oksidaza (KO) dönüşümüne yol açar. Normal şartlarda hipoksantin ürik asite metabolize olmaktadır ve bu reaksiyonda elektron alıcı nikotinamid adenin dinükleotidin okside formu (NAD^+)'dur. İskemi nedeniyle ksantin dehidrojenazın ksantin oksidaza dönüşmesi ile hipoksantinin ürik asite dönüşümü KO tarafından gerçekleştirilir ve bu reaksiyonda elektron alıcısı değişir ve moleküler oksijen kullanılır. Süperoksit radikali oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur, oluşan bu radikal güçlü bir antioksidan enzim olan süperoksit dismutaz (SOD) sayesinde başlı başına bir radikal olmayan hidrojen peroksite (H_2O_2) indirgenir. Oluşan hidrojen peroksit (H_2O_2) ise katalaz (KAT) veya glutatyon peroksidaz (GSH-Px) enzimleri tarafından toksik olmayan metabolitlere dönüştürülür. Ancak ortamda geçiş metallerinin varlığında oldukça toksik olan hidroksil iyonu (OH^-) oluşmaktadır (39). İskemi sonrasında ve reperfüzyonda bir dizi bağlantılı olay gerçekleşmekte ve hücreye zarar vermektedir (Şekil 1).



Şekil 2.1: İskemiye bağlı gelişen hücre içi değişimler

İskemi sırasında oksidatif fosforilasyon azalır ve mitokondrilerde ATP sentezlenemez. Hücre içinde ATP glikoliz yolu ve oksidatif fosforilasyon ile üretilir. Glikoliz ile oksijen kullanılmadan pirüvat, laktat dehidrogenaz (LDH) enzimi sayesinde laksit aside yıkılırken 2 ATP üretilir (40). Bir diğer yol olan oksidatif fosforilasyonda ise pirüvat ve laktat mitokondriye taşınır ve ancak bu basamak mutlaka oksijene ihtiyaç duyar bu sebeple ilerleyen iskemi dönemlerinde oksidatif fosforilasyon yapılamaz hale gelir. Bunun sonucunda hücrede sadece glikoliz yapılarak ATP üretilir ve ortamda sitrat, laktat, nikotinamid adenin dinükleotid (NADH) birikir ve doku ph'ı düşerek asidoz oluşur (40). Tüm bu faktörler ile membran hasarı kaçınılmaz olur.

İskemi reperfüzyon hasarında başlıca dört faktör önemli olup bunlar serbest oksijen radikallerinin oluşması, polimorf nüveli lökositler, kompleman sistemi ve endotel hasarıdır (41). Eşlenmemiş elektron içeren molekül veya atoma serbest radikal adı verilmektedir. Normalde atomlar ve moleküller eşlenmiş vaziyette bulunur ve reaktif değildir. Normalde vücutta bir miktar serbest oksijen radikali üretilir ve bunun büyük kaynağı hücrenin enerji kaynağı olan mitokondrilerdir (42).

İskemi reperfüzyon hasarında diğer önemli mekanizma polimorf nüveli lökositlerin (PMNL) aktive olmasıdır. Yine PMNL yüksek miktarda SOR oluşturabilmektedir. Diğer hasarlarını ise mikrovasküler oklüzyon, sitotoksik enzim salgılanması, vasküler geçirgenliğin artması ve sitokin salınması şeklinde oluşturmaktadır (43). Lökosit adhezyon molekülleri lökositlerde ve diğer başka hücrelerde bulunan sinyal iletimi ile haberleşme, inflamasyon ve apoptosis gibi çok sayıda ve çeşitte biyolojik olaylarda rol alan yapılardır. Selektin grubu adhezyon molekülleri, doku hasarı olan bölgede aktive olmuş endotele, PMNL'lerin başlangıçtaki adhezyonunda rol alırlar (44). Nötrofillerin bu göcü kapiller seviyede fiziksel obstrüksiyon yaratırlar. Bu durumun doğal sonucu olarak mikrodolaşımda fonksiyonel kapillerler kapanır, trombozis gelişir ve no-reflow fenomeni gelişir. Klinikte ise transfer edilen dokuda bu olaylar kısmi veya tam iskemi ile sonuçlanır (45). Nötrofiller azurofilik granüllerinde NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz gibi enzimleri içerir. Bu enzimler özellikle reperfüze dokuda ksantin oksidazın artması ile serbest oksijen radikallerinin salınması ile solunum patlaması olayını meydana getirmektedir.

Endotel hücreleri iskemi reperfüzyon hasarında bir diğer önemli role sahip hücrelerdir. Bu hücreler hem potaniyel SOR üreticisi iken hem de kendileri bu radikallerin zararlarından etkilenir. Endotel hücreleri mikrovasküler hemostazdan

sorumlu olan endotelin ve nitrik oksit (NO) üretir. NO arteryel dolaşımda endotelin etkisini tersine çevirir ve vazodilatasyon yapar, venler de ise tam tersi etki göstererek vazokonstriksiyona yol açar. İskemi reperfüzyon hasarı ise endotelin ve NO dengesini tersine çeviriri ve arterlerde vazokonstriksiyon venlerde vazodilatasyon olur (46).

Serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu hasarı önleyerek etki gösteren antioksidanlar çeşitli mekanizmalar ile etki gösterir (47). Antioksidan enzimler ve küçük moleküller serbest oksijen radikallerini tutar ve yok eder (8). Vitamin ve flavanoidler ise bu radikallere hidrojen vererek inaktif hale getirirler (14). Temel olarak antioksidanlar endojen ve eksojen olmak üzere iki gruba ayrılır (Tablo 1) (47).

Tablo 2.1: Endojen ve eksojen antioksidanlar

Enzim olan endojen antioksidanlar	**Enzim olmayan endojen antioksidanlar**
• Süperoksit dismutaz (SOD) • Glutatyon Peroksidaz (GSH-Px) • Glutatyon S-Transferaz (GST) • Katalaz (KAT)	• Melatonin • Seruloplazmin • Transferrin • Miyoglobin • Hemoglobin • Ferritin • Bilirubin • Glutatyon • Sistein • Metiyonin • Ürat • Laktoferin • Albumin
Vitamin eksojen antioksidanlar	**İlaç olarak kullanılan eksojen antioksidanlar**
• a-tokoferol (vitamin E) • β -karoten • Askorbik asit (vitamin C) • Folik asit (folat)	• Ksantin oksidaz inhibitörleri (Allopürinol, oksipürinol, pterin aldehit, tungsten) • NADPH oksidaz inhibitörleri (**Adenozin**, lokal anestezikler, kalsiyum kanal blokerleri, nonsteroid antiinflamatuvar ilaçlar) • Rekombinant süperoksit dismutaz • Trolox-C (Vitamin E analoğu) • Endojen antioksidan aktiviteyi artıranlar (GSH-Px aktivitesini artıran 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

2.3. Ön Koşullanma Yöntemleri

Plastik cerrahide doku defektlerinin onarımında kullanılan fleplerde kısmi veya total doku kaybı hala önemli bir problemdir. İskemi reperfüzyon hasarı ise bu komplikasyonların önemli bir nedenidir. Flep yaşayabilirliğini arttırmak amacıyla dokuyu önceden bir stres faktörüne maruz bırakarak nihai iskemiye toleransını arttırmak amacıyla çeşitli yöntemler denenmiştir. Flep eleve edilmeden önce uygulanan ve dokuyu "eğiten", "adapte eden" yöntemlere "ön koşullanma yöntemleri (preconditioning)'' adı verilmiştir (2). Başlıca ön koşullanma yöntemleri cerrahi geciktirme, iskemik ön koşullanma, uzak iskemik ön koşullanma ve farmakolojik ön koşullanmadır.

Cerrahi geciktirme flebin transferinden önce kan akımının kısmi şekilde kesilmesi şeklinde yapılır. Bu yöntem ile flebin distal kısmının yaşayabilirliğinde artış hedeflenmektedir. Cerrahi geciktirme işleminin mekanizması hala tam olarak anlaşılamamıştır. Ancak vaskülariteyi arttırdığı ve dokunun iskemiye toleransını arttırdığı düşünülmektedir. Ancak cerrahi geciktirme işleminin ek cerrahi bir işleme gereksinimi olması, komplikasyon, anestezi süresi ve maliyetinin fazla olması nedeniyle cerrahi bir rutin olarak kullanılamamaktadır (2).

İskemik ön koşullanma (İÖK) ise dokunun kısa aralıklarla iskemi ve reperfüzyona maruz bırakılarak dokunun uzun süreli iskemiye olan toleransını arttırma yöntemidir. İlk olarak Murry ve arkadaşları 1986 yılında, koroner arter üzerinde klempleme ile oluşturdukları kısa iskemik periyotları ve bunu takiben doku reperfüzyonları ile köpek miyokardında daha uzun bir iskemik periyoda dayanıklılığın arttığını göstererek, klasik iskemik ön koşullanma fenomenini tanımlamışlardır (49). Bu model daha sonra beyin, iskelet kası, barsak, karaciğer, akciğer ve böbrek iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla bir çok çalışmada kullanılmıştır (50, 51, 52, 53, 54, 55). İskemik ön koşullanmanın koruyucu etkinliği akut ve geç etki olmak üzere ikiye ayrılır. Akut faz dönemi 2 ila 4 saat arasında etkili iken, geç etki 24 ila 72 saat etkilidir (50). İlk etkinlik sinyal üretimi ve reseptör etkileşimlerine bağlıdır, ancak geç etkinlik protein sentezine bağımlıdır. İskemik ön koşullanmanın koruyucu etkinliğinin görülmesi için yapılan iskemi reperfüzyon periyodlarını için ideal süre, kaç kez yapılacağı ve bu sürelerin uzunluğu tartışmalıdır (2). Örneğin Pang ve arkadaşları,

domuz latissimus dorsi kasında 3 döngü halinde 10 dakika iskemiyi takiben 10 dakika reperfüzyon uygulayarak iskemik önkoşullamanın koruyucu etkisini sağlamıştır (51).

İskemik ön koşullanma nöral, humoral ve sistemik bir çok faktörün etkileşimi ile etkisi görülen kompleks, adaptif biyolojik fenomendir. İskemi reperfüzyon hasarının oluşum mekanizması anlaşıldıkça bunu önlemeye yönelik yapılan ön koşullanmaların mekanizması da daha anlaşılabilir olmuştur. Özellikle kardiak iskemi reperfüzyon hasarını engellemeye yönelik çalışmalar en başından beri ön koşullanma yöntemleri için yol göstericidir (50). İÖK temel olarak üç sinyal mekanizması üzerinden etki etmektedir. Bunlar; tetikleyici mediatörlerin salınması (Tablo 2.2), hücre içi mediator kaskadının aktifleşmesi ve effektör mekanizmaların aktifleşip cevap oluşturmasıdır. Bu mediatörler etkisini büyük çoğunlukla G proteinler ile ilişkili reseptörler üzerinden göstermektedir. Bu reseptörler mediator salınımı ile uyarılınca hücre içinde bir dizi olay gerçekleşmektedir. Örneğin adenozin salınımı, protein kinaz C'yi direkt olarak uyarmakta ve endoteliyal NO salınarak iskemik ön koşullanma mekanizmasında oldukça önemli olan mitokondriyal potasyum kanallarının açılmasını sağlamaktadır. Bu kanalların açılmasıyla açığa çıkan serbest oksijen radikalleri (SOR), koruyucu sinyal yollarındaki kinazları aktive etmektedir. İskemi sırasında serbest oksijen radikalleri, mitokondriyal permeabilite transizyon porunun aktivasyonunu tetikleyip, mitokondriyal depolarizasyona yol açıp, reperfüzyon sırasında hücre ölümüne neden olmaktadır. Ön koşullanma sırasında SOR artışı ile birlikte antioksidan seviyesinde de artış olmakta, K^+ kanal açıcıları verilince SOR parçalanması bloke olmakta ve hücreler korunmaktadır (50).

Uzak iskemik ön koşullanma (UİÖK) başka bir organa uygulanan iskemi reperfüzyon epizodlarının başka bir organda iskemiye olan toleransının arttırılmasıdır (56). İlk olarak 1993 yılında Przyklenk ve arkadaşları tarafından köpek kalbinde etkinliği gösterilmiştir (57). Uzak iskemik ön koşullanmanın etki mekanizması iskemik ön koşullanmanın etki mekanizmasına benzemektedir. Yine iskemik ön koşullanma yapılırken iskemi aynı dokuya uygulanmalıdır, bu da uygulanmasını zorlaştırmakta ve bazen de dokuya zarar vermektedir. Ancak uzak iskemik ön koşullanma özellikle ekstremite kullanılarak yapılırsa dokuya ayrıca bir zarar verilmez.

UİÖK nöral, humoral ve sistemik mekanizmalar üzerinden koruyucu etkinlik gösterir. Humoral mekanizma direkt iskemik ön koşullanmada salınan mediatörlerinin salınması ile etki gösterir. Yapılan çalışmalarda UİÖK yapılan deneklerden alınan kanlarda bazı mediatörlerin dikkat çekici ölçüde yüksek olduğu ve bu mediatörlerin koruyucu etkinlikte önemli olduğu anlaşılmıştır (Tablo 2.2) (56). Literatürde bu mediatörlerin antagonist ve agonist etkileri özellikle mekanizmanın anlaşılabilmesi için önemli bir yere sahip olduğu görülmektedir. Ancak nöral mekanizma uzak iskemik ön koşullanmada daha kompleks yolakların etkili olduğunu doğrulamaktadır. Yapılan bazı çalışmalarda uzak iskemi yapılacak organda afferent sinirlerin kesilmesini koruyucu etkinliği azalttığı gösterilmiştir. Örneğin ganglion bloker olan heksametonyumun sistemik uygulanması ile UİÖK etkinliğinin azaldığı gösterilmiştir (21).

Tablo 2.2: İskemik ön koşullanmada salınan mediatörler

İskemik ön koşullanma sırasında ortama salınan mediatörler:
• **Adenozin** • Katekolaminler • Prostaglandinler • Kalsiyum • Endotelin • Isı şok proteinleri • Anjiotensin II • Bradikinin • Kalsitonin gen ilişkili peptid • Nitrik oksit • Sitokinler

Uzak iskemik ön koşullanma oluşturmak amacıyla ekstremiteye uygulanan turnike uygulamasının hem adipokutan hem de kas fleplerinde flep pedikülüne klemp konarak yapılan ön koşullanma kadar efektif olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (58, 59). Küntscher ve arkadaşları uzak iskemik ön koşullanma ile kapiller perfüzyonun artması ve postkapiller inflamatuar cevabın azalmasına bağlı olarak koruyucu etkisinin olduğunu göstermişlerdir (59).

Son yıllarda insanlar üzerinde yapılan UİÖK çalışmaları mevcuttur. Bu çalışmalarda UİÖK modeli olarak uygulaması kolay bir yöntem olan üst veya alt ekstremite turnike sarılarak çalışma modelleri oluşturulmuş ve başarılı sonuçlar alınmıştır (56). İnsan çalışmalarında iki ile dört kez beşer dakikalık UİÖK üst ekstremite ve alt ekstremiteye turnike sarılarak uygulanmış ve bu turnike anlık sistolik basıncın yaklaşık 15-40 mmHg üzerinde şişirilerek iskemi sağlanmıştır (21).

Dışardan bir ajan uygulayarak iskemik ön koşullanmayı taklit etmeye "farmakolojik ön koşullanma" denir. Farmakolojik ön koşullanma ile değişik mekanizmalar üzerinden etki ederek iskemi reperfüzyon hasarının azaltılmasını amaçlanmaktadır (2). Yapılan çalışmalarda özellikle ön koşullanmada salınan mediatörlerin agonistleri ve antogonistleri kullanılarak hem farmakolojik ön koşullanma ve iskemik ön koşullanma yöntemleri kıyaslanmakta hem de mediatörlerin etkinliği araştırılmaktadır (56) Örneğin vazodilatasyon yaparak etki eden kalsiyum kanal blokeri gibi ajanlar perfüzyonu arttırarak doku nekrozunu azaltmaktadır (60). Güçlü bir antioksidan olan adenozinin topikal uygulaması ile flep yaşayabilirliğinin anlamlı ölçüde arttırıldığı gösterilmiştir (61). Günümüzde antienflamatuar ve antioksidan bir çok ajan ile farmakolojik ön koşullanma yapılmaktadır.

2.4 Adenozin ve Etki Mekanizması

Adenozin, pürin bazlarından biri olan adenine, bir pentoz halkasının eklenmesiyle oluşan doğal bir nükleoziddir (5). Hücre içi ve dışında devamlı sentezlenen ve kullanılan adenozinin çeşitli fizyolojik olaylarda rolü olduğu ilk kez 1929 yılında ortaya atılmıştır. Drury ve arkadaşları ilk olarak kalp kasından salgılanan bu molekülün hem potent bir şekilde kalp kasında kasılma gücünü azaltıcı etkili olduğunu hem de arterlerde vazodilatasyon sağlayan ekstrasellüler bir sinyal molekülü olduğunu gösteren bir çalışma yapmışlardır (63). Bu molekülün, etkilerini kendine özgü reseptörler aracılığı ile oluşturduğu ise 1974'de anlaşılabilmiştir. İskemi, hipoksi, travma, stres, nöbet, ağrı ve inflamasyon gibi durumlarda üretimi artmaktadır (64).

Adenozinin merkezi sinir sistemi ve periferik organlarda bir çok çeşitli fizyolojik ve patofizyolojik olayların gelişiminde rolü vardır. Adenozin hücresel enerji gereksiniminin akut olarak yetersiz kaldığı durumlarda, özellikle iskemi reperfüzyon hasarında önemli bir lokal düzenleyicidir. Metabolizma hızı ne kadar fazla veya

oksijen düzeyi ne kadar az ise, vazodilatatör madde oluşumu da o kadar fazladır. Bu maddelerin içnde adenozinin yanı sıra karbondioksit, laktik asit, adenozin fosfat bileşikleri, histamin, hidrojen iyonu, bradikinin ve prostaglandinler de yer almaktadır. Adenozin, dokuyu iskemiden koruyan en önemli lokal vazodilatatör olup, vazodilatasyon yoluyla dokuya enerji sağlanmasını arttırmak için kan akımını artırır, stres altındaki dokunun enerji gereksinimini azaltır. Adenozin iskemiye bağlı gelişebilecek hücresel hasara karşı koruyucu rol oynamaktadır (56). Adenozin, bahsedilen bu rollerini özellikle; kalp, beyin, böbrek, endotel hücreleri, lökositler ve trombositler gibi iskemik hasara aşırı duyarlılığı olan doku ve hücre gruplarında oluşturur.

En önemli adenozin kaynağı hücre içinde devamlı kullanılan adenozin trifosfat (ATP) ve siklik adenozin monofosfat (cAMP)'dır (65). Bu iki nükleotid hücre içinde önce adenozin monofosfat (AMP)'a yıkılır ve oluşan AMP hücresel 5'-nükleotidaz enziminin katalizlediği biyokimyasal bir reaksiyon ile adenozine çevrilir (66). Organizmada diğer önemli adenozin kaynağı katekolaminlerin ve histaminin katabolizması sırasında ortaya çıkan ve adenozine hidrolize edilebilen S-adenozil homosisteindir ve normal oksijenlenen ortamlarda, adenozinin büyük bir kısmı S-adenozil homosistein yolundan elde edilir (67).

Hipoksik durumlarda ise asıl yolak ATP yolağıdır. Hücre dışında üretilen adenozinin en önemli kaynağı ATP'dir. ATP presinaptik sinir uçlarında bulunan veziküllerde dopamin, asetilkolin gibi nörotransmitterlerle birlikte bulunur, nörotransmitterlerin salınımı sırasında hücre dışına çıkar. Hücre dışında önce AMP'ye sonra da ekto-5'nükleotidaz enzimi aracılığı ile adenozine çevrilir (68).

Üretilen ve salıverilen adenozin iki mekanizma ile dokulardan uzaklaştırılmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki pürinerjik sinir ucunda nükleozit taşıyıcı sistemleri (ENT1-ENT2) aracılığı ile geri alınarak tekrar ATP sentezinde kullanılmasıdır. Bu taşıyıcılar normalde hücre içine doğru görev yaparlarken iskemi de ters yöne akım olur (66). Diğer mekanizma ise adenozinin enzimatik yıkılımıdır. Burada iki enzim rol oynar. Bu enzimler sadece hücre içinde bulunan adenozin kinaz ve hücrenin hem içinde ve hem de dışında bulunan adenozin deaminazdır. Normalde taşıyıcılar ile hücre içine alınan adenozin adenozin kinaz ile fosforillenerek AMP

oluşturulur. Patolojik durumlarda ise hücre içinden dışına doğru adenozin çıkar ve adenozin deaminaz aktivitesi önem kazanır (69).

Pürinler ile onların nükleozit ve nükleotid formları, hücre içi ve hücreler arasındaki iletişime önemli katkılar sağlar. Bu iletişim, hücre yüzeyinde, plazma membranına yerleşmiş reseptörler aracılığı ile gerçekleşir. Adenozin, bilinen farmakolojik etkilerini G proteinine kenetli A_1, A_{2a}, A_{2b} ve A_3 olmak üzere dört grup reseptör üzerinden gösterir (62). Adenozin reseptörleri ve etki mekanizmaları Tablo 2.2'de gösterilmiştir (70,71,72) (Tablo 2.3).

Tablo 2.3: Adenozin reseptörleri ve etki mekanizmaları

Adenozin A_1 reseptörleri	**Adenozin A_{2a} ve A_{2b} reseptörleri**	**Adenozin A_3 reseptörleri**
• Adenilat siklaz inhibisyonu • K-ATP kanallarının aktivasyonu • N, P ve Q tipi kalsiyum kanallarının inaktivasyonu • Fosfolipaz C aktivasyonu • Katekolamin salınımının baskılanması • Nötrofilleri aktive ederek kemotaksisin artırılması • Lipid peroksidasyonunu engellenmesi • Hücresel membranlarını stabilize edilmesi • Antilipolitik etkisi ile aynı zamanda hücre içi laktat üretiminin ve buna bağlı asidozun azaltılması • Reperfüzyon sonrası ksantin oksidaz enzimi aracılığı ile superoksit anyonu oluşumunun sınırlanması	• Adenilat siklaz aktivasyonu • N tipi kalsiyum kanallarının aktivasyonu • Nötrofillerden serbest oksijen radikallerinin salınımının inhibisyonu • Trombosit agregasyonunu inhibisyonu	• Adenilat siklaz inhibisyonu • Fosfolipaz C/D aktivasyonu

Ön koşullanma yöntemlerinde iskemi periyodu ve reperfüzyon, adenozin ve diğer potansiyel koruyucu maddelerin (bradikinin gibi) salınımını artırır (56). Adenozin ve diğer maddelerin aktive ettiği reseptörler, G proteinleri aracılığıyla fosfolipazlarla kenetlenir. PLC (fosfolipaz C) ve/veya PLD (fosfolipaz D) etkisi ile salınımı gerçekleşen DAG, protein kinaz C'nin aktivasyon ve translokasyonunu aktive eder. PKC türlerinden ε-PKC ve α-PKC sarkolemmal membrana geçerken, δ -PKC mitokondriyal membrana geçer. Diğer kinazlar özellikle de P38-mitojenin aktiflediği protein kinaz aktif hale gelerek mitojenin aktiflediği kinazla aktive olan protein kinazın fosforilasyonunu indükler. δ -PKC, sitoskeletal aktin filament polimerazyonunu kontrol eden ısı şok proteinini fosforiller (56).

Adenozinin iskemik ön koşullanmada etki mekanizmasında K_{ATP} kanallarının rolü oldukça önemlidir (72). Bu bahsedilen kaskadın bir noktasında ATP duyarlı potasyum kanallarının açılması artarak, dokunun korunmasını sağlar. ATP-duyarlı potasyum kanalları, damar düz kas hücresinde ve kalp kası hücresinde bulunur. Bu kanalların açılması erken iskemi sırasında hücre dışına kısmi K^+ atılımına neden olur. K_{ATP} kanallarının adenozinin etkisi ile aktifleşmesi sonucunda, iskemik ön koşullanma yoluyla adaptasyon meydana gelmektedir. Deneysel çalışmalarda, iskemi reperfüzyon hasarı sırasında, aktif K-ATP kanallarının açılarak Ca^{++} girişini sınırladığı bildirilmiştir (73). Miyawaki ve arkadaşları adenozin A_1 uyarımlı ön koşullanma ile hücrede Ca^{++} yüklenmesinin azaldığını göstermişlerdir (74).

Yapılan son çalışmalarda adenozinin doku üzerinde diğer önemli koruyucu etkisini immun sistem üzerinden gerçekleştirdiğini gösterilmiştir. Adenozin salınımından sonra, hücrede aşırı immun cevabı engelleyecek güçlü bir endojen immunsüpresif etki göstermektedir (5).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu deneysel tez çalışması için Ankara Üniversitesi Yerel Etik Kurulu'ndan 20.09.2017 tarih ve 2017-19-155 karar numaralı etik kurul onayı alınmıştır. Etik kurul onayını takiben çalışma, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Tıbbi Patoloji Anabilim Dalı ve Fizyopatoloji Bilim Dalı'nın olanakları kullanılarak, Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarında yürütülmüştür.

3.1. Deney Hayvanları

Çalışmada Ankara Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Laboratuvarı'nda yetiştirilmiş toplam 35 adet, ağırlıkları 200-300 gram arasında değişen Wistar Albino cinsi dişi rat kullanıldı. Ratlar hayvan laboratuarında uygun kafeslerde, 21 +/-2 santigrat derece sıcaklıkta ve ışıkların saat 08:00'de yakılıp, saat 20:00 de söndürülmesiyle 12 saat aydınlık, 12 saat karanlık ritminin sağlandığı koşullarda barındırıldı ve standart yem ile beslendi, herhangi bir diyet ya da su kısıtlaması yapılmadı.

3.2. Gereçler

Çalışmada kullanılan cerrahi gereçler, sarf malzemeleri ve ilaçlar:

1- Temel cerrahi aletler (pens, penset, portegü, bistüri sapı, bistüri, vb.)
2- Steril enjektörler (1, 2.5, 5, 10 cc)
3- Steril cerrahi eldiven
4- Steril cerrahi gazlı bez
5- Çizim kalemi
6- Mikroklemp
7- Traş bıçağı
8- Povidone iodine
9- Cetvel
10- Adenozin (Adozin 10mg/2ml I.v. ampul, VEM İlaç, Türkiye) (Şekil 3.1)
11- Ketamin baz (Ketalar®, Pfizer, New York, Amerika Birleşik Devletleri) (Şekil 3.2)
12- Ksilazin (Alfazyne® %2, Alfasan International BV, Voerden, Hollanda) (Şekil 3.2)

13- Serum fizyolojik
14- Nikon Eclipse E600 ışık mikroskop
15- Lam, lamel
16- Formol
17- Hemotoksilen eozin boyası
18- Etanol
19- Parafin, ksilen
20- Formaldehit



Şekil 3.1: Çalışmada kullanılan preparat

Adenozin (Adozin 10mg/2ml I.v. ampul, VEM İlaç, Türkiye)



Şekil 3.2: Çalışmada kullanılan anestezik ilaçlar

Ketamin (Ketalar®, Pfizer, New York, Amerika Birleşik Devletleri) &Ksilazin (Alfazyne® %2, Alfasan International BV, Voerden, Hollanda)

3.3. Yöntem

Hayvanlar randomize olarak her bir grupta 7 hayvan olacak şekilde öncelikle 5 gruba ayrıldı. Anestezi intraperitoneal (i.p.) 80 mg/kg ketamin (Ketalar, Pfizer Pharma GMBH, Germany) ve 10 mg/kg ksilazin hidroklorid (Alfazyne % 2, Alfasan International, Holland) ile sağlandı. Gerektiğinde ratların anestezi derinliğini sabit tutmak için ketamin (yarı dozda, 40 mg/kg) refleks yanıtlara (pensetle ayağa ağrılı uyaran verilmesi, pedal refleks, palpebral ve korneal refleksler) bakılarak tekrarlandı.

3.3.1. Çalışma Grupları

Tablo 3.1: Çalışma grupları

Grup I (Sham, n=7):

300 dakika

Grup II (iR. n=7):

Flepte 2 saat iskemi	Flepte 2 saat reperfüzyon

Grup III (UiöK. n=7):

Sol arka bacağa 10 dk iskemi+10 dakika reperfüzyon x 3

Grup IV (UiöK + iR. n=7):

Sol arka bacağa 10 dk iskemi+10 dakika reperfüzyon x 3	Flepte 2 saat iskemi	Flepte 2 saat reperfüzyon

Grup V (UiöK + ADENOZiN + iR, n=7):

Sol arka bacağa 10 dk iskemi+10 dakika reperfüzyon x 3	1 mg/kg ADENOZİN	Flepte 2 saat iskemi	Flepte 2 saat reperfüzyon

Grup I (Sham, n=7): Epigastrik flep hazırlanma sonrası anestezinin 60. dakikasında flep pedikülü diseke edilip başka bir girişim yapılmadan ratlar 240 dakika daha anestezi altında bekletildi. Böylelikle en uzun çalışma grubu süresi kadar (300 dakika Grup V) anestezi süresi sağlandı.

Grup II (İR, n=7): Epigastrik flep hazırlanma sonrası anestezinin 60. dakikasında Grup V'teki adenozin ile aynı hacimde SF i.p. yapıldı, flep pedikülüne klemp konarak 120 dakika total iskemi ve sonrasında 120 dakika reperfüzyon uygulandı.

Grup III (UİÖK, n=7): Epigastrik flep hazırlanma sonrası sol arka bacağa 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon üç döngü uygulandıktan sonra Grup V'teki adenozin ile aynı hacimde SF i.p. yapıldı, başka bir girişim yapılmadan ratlar 240 dakika daha anestezi altında bekletildi.

Grup IV (UİÖK + İR, n=7): Epigastrik flep hazırlanma sonrası sol arka bacağa 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon üç döngü uygulandıktan sonra Grup II'deki işlemler tekrarlandı.

Grup V (UİÖK + ADENOZİN + İR, n=7): Epigastrik flep hazırlanma sonrası sol arka bacağa 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon üç döngü uygulandıktan sonra anestezinin 60. dakikasında 1 mg/kg adenozin i.p. verildikten sonra Grup II'deki işlemler tekrarlandı.

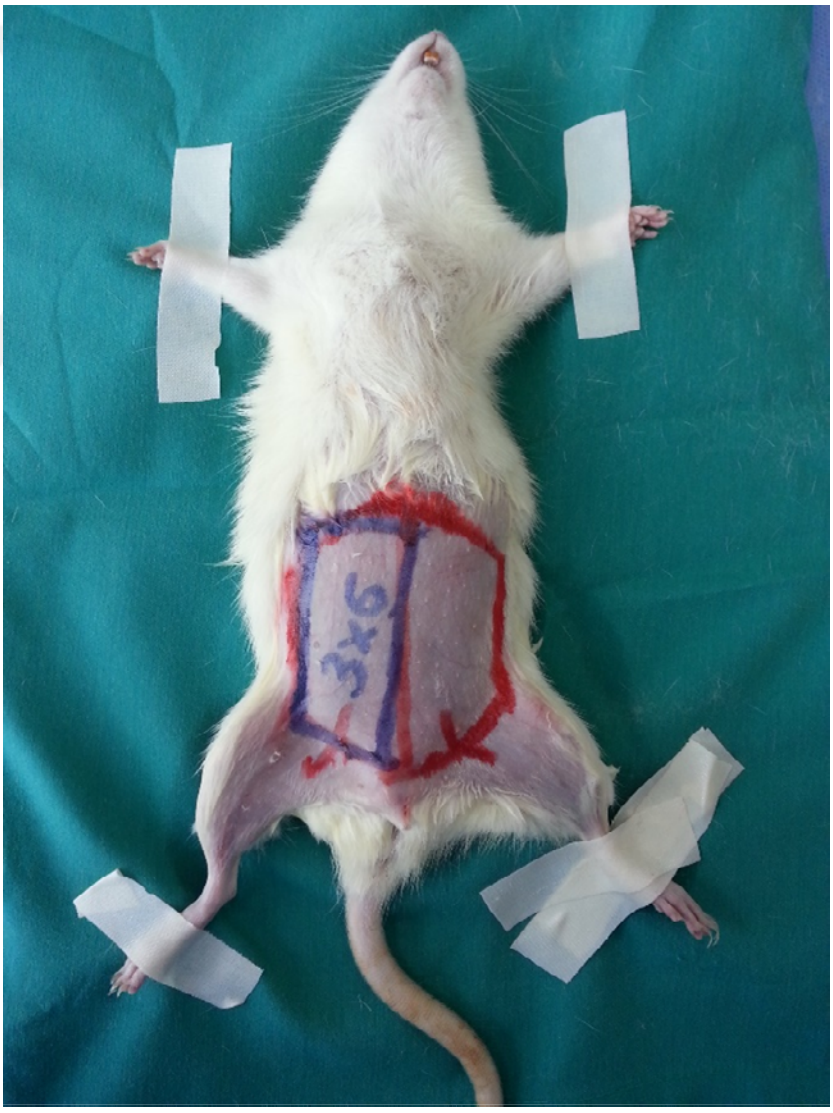
Grup I'de flep pedikülünün diseksiyonuna, Grup II'de iskemiye 60.dakikada başlamadaki amaç; Grup III, IV ve V'deki ön koşullama süresine eşitlemek ve böylelikle tüm gruplarda anestezi süresinin (300 dk.) aynı olmasını sağlamaktır. Doku örnekleri reperfüzyon sonunda alındı.

3.3.2. Cerrahi Teknik

Anestezi sağlanmasının ardından her sıçanın karın ön yüzü ameliyat öncesi traş edildi ve povidone iodine ile cerrahi alan temizliği yapıldı. İskemi reperfüzyon flep modeli oluşturmak için inferior epigastrik flep kullanıldı. İlk olarak 1967 yılında Strauch ve Murray tarafından tanımlanmış olan inferior epigastrik flep diğer adıyla kasık flebi kolay hazırlanması nedeniyle deneysel araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (75). İlk tanımlandığı çalışmada 6x4 cm boyutlu flep diğer çalışmalarda farklı dörtgen şekillerde kullanılmıştır (76). 1984 yılında Petry ve

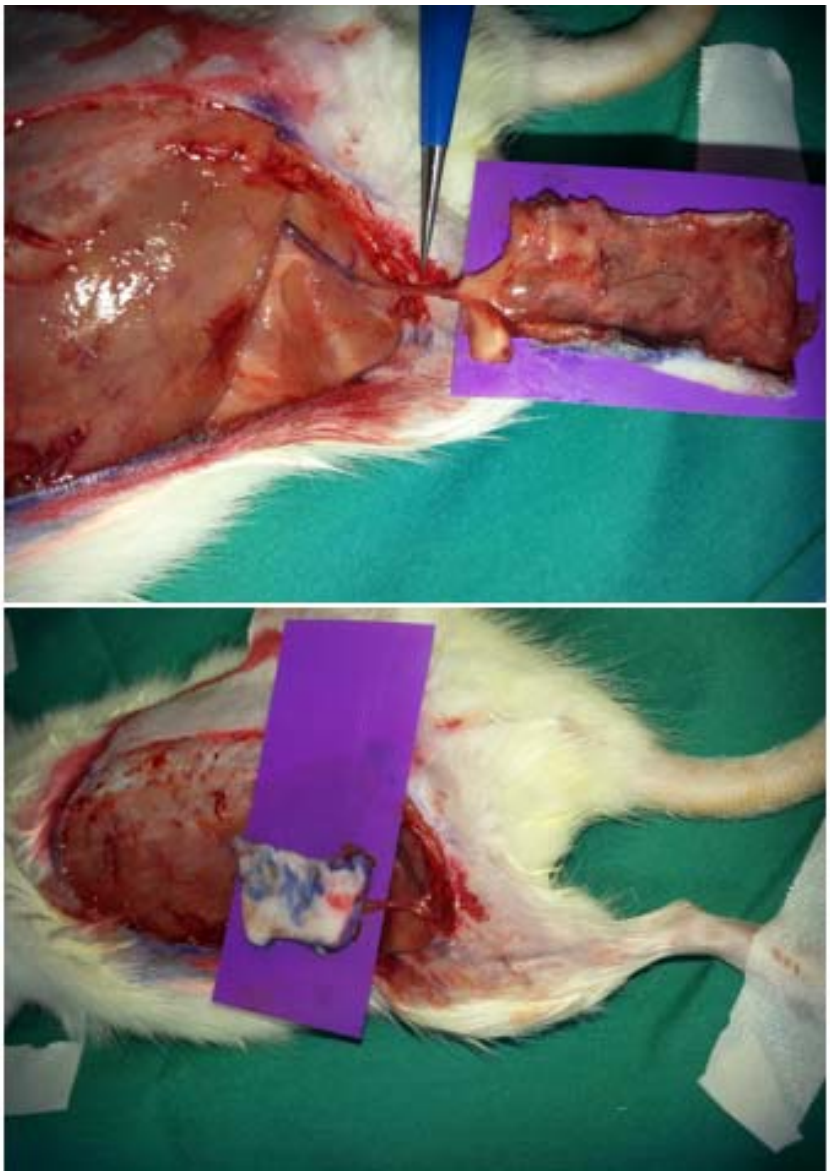
Wortham tarafından farklı tasarımlar arasında ortaya çıkan tutarsızlıkları gidermek amacıyla flep lateral sınırı damar anatomisi ışığında belirlenmiştir (77).

İnferior epigastrik flep dikey sınırlarını ortada ksifoidden pubise çekilen çizgi ile yatay sınırlarını ise yukarıda kosta kavsi, lateralde aksiller çizgi ve aşağıda da inguinal ligamanın oluşturduğu dörtgen şekilli bir deri bölgesinin yüzeyel epigastrik damarlarla beslenen aksiyel paternli bir ada flebi haline getirilmesi ile hazırlanmaktadır. Bu bilgiler doğrultusunda ratın karnında medialde orta hat çizilerek yukarıda ksifoidi aşağıda simfizis pubisi ve lateralde arka aksiller çizgiyi geçmeyecek şekilde 3x6 cm boyutlarında inferior epigastrik flep planlandı (Şekil 3.3).



Şekil 3.3: Sıçan karnında 3x6 cm'lik tek taraflı inferior epigastrik flebin planlanması

Orta hattan insizyona başlanıp flep medialden laterale doğru diseke edildi. Flep pedikülü inferior epigastrik arter, inferior epigastrik ven ve siniri içerecek şekilde hazırlandı (Şekil 3.4). Bekleme süreleri boyunca cerrahi alanlar ıslak steril tamponlar ile kapatıldı.



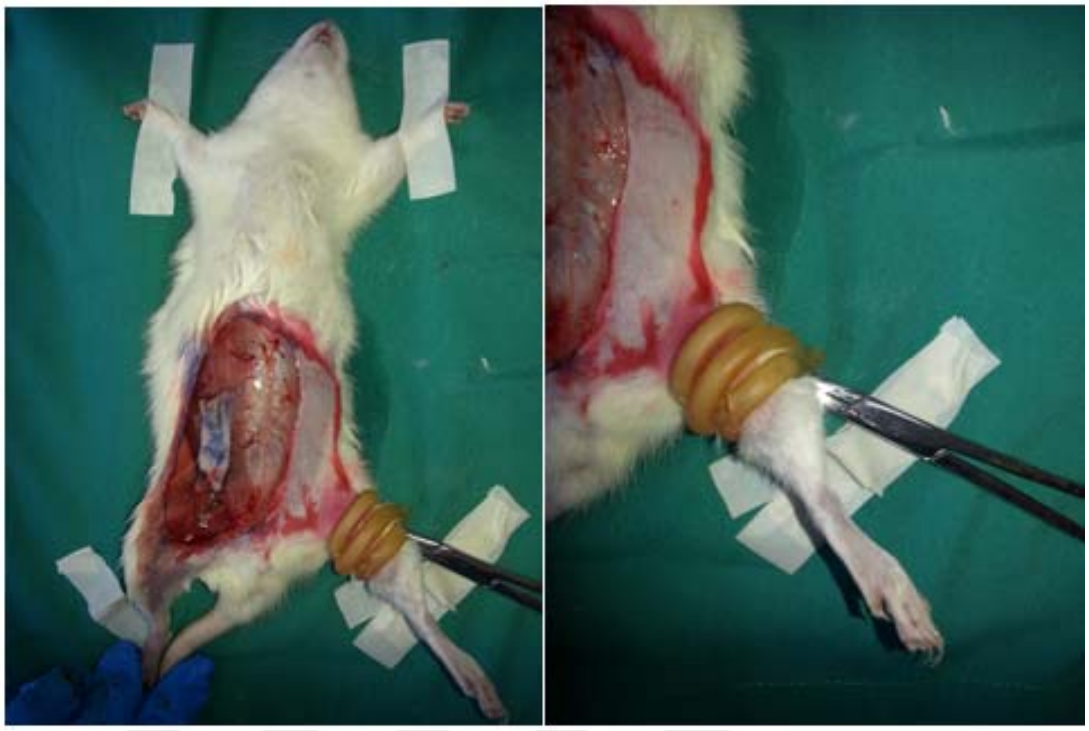
Şekil 3.4: Flebin pedikülünün hazırlanması, flebin elevasyonu

Total flep iskemisi, atravmatik mikrovasküler klemp ile pedikül sıkıştırılarak flebe giden inferior epigastrik ven ve arter akımı engellenerek sağlandı (Şekil 3.5).



Şekil 3.5: Flebin pedikülüne mikroklemp konarak iskemi sağlandı

Uzak iskemik ön koşullanma amacıyla turnike etkisi için ratın sol arka bacağı kasık bölgesinden elastik bandaj (1 cm eninde ve 30 cm uzunluğunda) ile üç kez çepeçevre dolanarak sıkıldı (Şekil 3.6). Üç döngü halinde 10 dakika iskemi oluşturulup takiben 10 dakika reperfüzyon sağlandı.



Şekil 3.6: Uzak iskemik ön koşullanma modeli

Tüm gruplarda total çalışma süresi sonunda anestezi altındaki ratlardan biyokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla flep distalinden örnekler alındı ve deney protokolu sona erince yüksek doz anestezik madde uygulanarak ratlar sakrifiye edildiler.

3.4. Değerlendirme Yöntemleri

3.4.1. Biyokimyasal İnceleme

Alınan doku örnekleri düz biyokimya tüpüne aktarıldı ve santrifüj edildikten sonra epend-off mikrosantrifüj (ependorf tüpü) tüpüne alınarak -80 derecede saklandı. Alınan doku örneklerinin ağırlıkları ölçüldü ve ağırlıklarının 4 katı hacimde triton x solüsyonu ve proteaz inhibitörlerinden oluşan koktely ile homojenize edildi. Alınan örneklerde total antioksidan kapasite ve total oksidan stres ölçümü, TNF – alfa ve IL-8 düzeyleri Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Fizyopatoloji Bilim Dalı laboratuarında toplu olarak bir defada çalışıldı.

Total antioksidan kapasite (TAK) ölçümü ve total oksidan stres (TOS) ölçümü yapmak üzere Rel Assay Diagnostics (Gaziantep, Türkiye) test kitleri kullanıldı. IL-8 ve TNF-alfa düzey ölçümleri ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) yöntemi

ile özel kitler kullanılarak (eBiosciences Platinium ELISA kits, ThermoScientific) gerçekleştirildi. Sonuçlar pg/ml olarak verildi. Ölçümlerde aynı spektrofotometre cihazı (Epoch Microplate Spectrophotometer, BioTek, USA) kullanıldı.

Total antioksidan kapasite ölçümü 2,2'-azino-bis (3-etilbenz-thiazoline- 6-sulfonik asid) (ABTS) radikalinin oluşturduğu karakteristik rengin ortama ilave edilen numunedeki antioksidanlar ile açılması esasına dayanan otomatik ölçüm metodu ile belirlendi. Sonuçlar Trolox eqivalen mmol /L olarak verildi.

Total oksidan stres ölçümü otomatik ölçüm metodu ile belirlendi. Örnekteki oksidanlar ferröz iyon-o-dianizidin kompleksini ferrik iyona dönüştürürler. Ferrik iyonu asidik ortamda ksilenol oranj ile renkli kompleks oluşturur. Spektrofotometrik olarak ölçülen rengin yoğunluğu örnekte bulunan oksidan moleküllerin total miktarı ile ilişkilidir. Ölçüm hidrojen peroksit (H2O2) ile kalibre edilerek sonuçlar litrede mikromolar H_2O_2 eqivalanı (µmol H_2O2 equiv./L) olarak belirlendi.

3.4.2. Histopatolojik Değerlendirme

Deney gruplarından doku örnekleri alındı ve %10'luk tamponlu formalin (pH: 7.35) çözeltisine alınarak tespit edildi. Daha sonra doku örnekleri tam kat görülebilecek şekilde kesilerek örneklendi. Alınan örnekler otomatik doku takip cihazında takip edildikten sonra, parafin bloklara gömüldü ve +4 °C'de bekletildi. Kesim işlemine başlamadan önce -18°C'ye alınan bloklardan mikrotom cihazı ile doku örneğinin uzun eksenine paralel olacak ve tüm deri katlarını içerecek şekilde 4 µm kalınlığında kesitler alındı. Kesitler Hematoksilen Eozin (H-E) histolojik boyası ile boyandı ve ışık mikroskobuyla incelenerek histopatolojik inceleme ve skorlama yapıldı. 3DHISTECH firmasının Pannoramic 250 Digital tarayıcısı ile tarandı ve fotoğraflandı.

Doku örneklerinde iltihabi hücre, polimorfo nüveli lökosit (PMNL), lenfosit infiltrasyonu, papiller ve retiküler dermiste ödem, nekroz olmak üzere 3 parametre incelendi. Örnekler değerlendirilirken Tablo 3.1'deki skorlama sistemi kullanıldı.

Tablo 3.2: Histolojik değerlendirmeler yapılırken kullanılan skorlama sistemi

	Yok	Az	Orta	Yoğun
PMNL ve lenfosit yoğunluğu	0	1+	2+	3+
Papiller dermiste ödem	0	1+	2+	3+
Nekroz	0	1+	2+	3+

3.4.3. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizi SPSS 11.5 Windows sürümünde yapılmıştır. Tanımlayıcı olarak nicel değişkenler için ortalama±standart sapma ve ortanca (minimum-maksimum), nitel değişkenler için ise sayı (yüzde) kullanılmıştır. İki kategorik değişken arasındaki ilişkiye bakmak için Ki-kare ve Fisher Exact testleri kullanılmıştır. Nicel değişken için ikiden fazla gruba sahip kategorik değişkenin kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığına, normal dağılım varsayımları sağlanıyorsa One Way ANOVA, sağlanmıyorsa Kruskal Wallis testi kullanılarak bakılmıştır. Nicel değişken için iki gruba sahip kategorik değişkenin kategorileri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık olup olmadığına bakmak için, normal dağılım varsayımları sağlanmadığı için Mann Whitney U testi kullanılmıştır. İstatistiksel anlamlılık düzeyi 0.05 olarak alınmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Biyokimyasal Bulgular

Tüm gruplardan alınan örneklerde total antioksidan kapasite ve total oksidan stres, TNF – alfa ve IL- 8 düzeyleri ölçülmüştür (Tablo 4.1, Tablo 4.2, Tablo 4.3, Tablo 4.4).

TOS değişkeni için grup kategorileri (1, 2, 3, 4, 5) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p=0.005). Bu anlamlı farklılığı yaratan ikili gruplara Mann-Whitney U testi ile baktığımızda Grup 2-Grup 5 (p=0.005) arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 4.6). Buna göre uzak iskemik ön koşullanma ile adenozinin birlikte uygulandığı grupta total oksidan seviyesi iskemi reperfüzyon kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı ölçüde az bulunmuştur.

IL-8 değişkeni için grup kategorileri (1, 2, 3, 4, 5) arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmuştur (p<0.001). Bu farklılık sham grubunda IL-8 düzeyinin anlamlı olması ile ilişki bulunmuştur. Bu anlamlı farklılığı yaratan ikili gruplara Tukey post hoc testi ile baktığımızda Grup 1-Grup 2 (p<0.001), Grup 1-Grup 3 (p<0.001), Grup 1-Grup 4 (p<0.001), Grup 1-Grup 5 (p=0.001), Grup 2-Grup 4 (p=0.013), Grup 3-Grup 5 (p=0.020), Grup 4-Grup 5 (p=0.004) arasındaki farklar istatistiksel olarak anlamlıdır (Tablo 4.6).

Tablo 4.1: Gruplarda TAK değerleri

	Grup 1	**Grup 2**	**Grup 3**	**Grup 4**	**Grup 5**
D1	1.39	1.57	1.39	1.42	1.38
D2	1.70	1.63	1.46	1.56	1.70
D3	1.64	1.67	1.42	1.65	1.74
D4	1.41	1.68	1.39	1.41	1.62
D5	1.57	1.61	1.46	1.65	1.76
D6	1.87	1.48	1.56	1.70	1.73
D7	1.61	1.29	1.42	1.52	1.67

(Grup 1: Sham, **Grup 2:** İR Kontrol, **Grup 3:** UİÖK Kontrol, **Grup 4:** UİÖK+İR, **Grup 5:** UİÖK+Adenozin+İR)

Tablo 4.2: Gruplarda TOS değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
D1	0.74	0.51	0.60	0.59	0.58
D2	0.64	0.71	0.47	0.59	0.47
D3	0.68	0.57	0.51	0.42	0.47
D4	0.59	0.71	0.59	0.63	0.51
D5	0.51	0.75	0.55	0.58	0.50
D6	0.63	0.65	0.54	0.56	0.50
D7	0.55	0.78	0.51	0.40	0.41

(Grup 1: Sham, **Grup 2:** İR Kontrol, **Grup 3:** UİÖK Kontrol, **Grup 4:** UİÖK+İR, **Grup 5:** UİÖK+Adenozin+İR)

Tablo 4.3: Gruplarda TNF-alfa değerleri

	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
D1	0.90	1.38	1.34	0.97	0.90
D2	0.49	0.96	0.70	0.78	0.78
D3	0.50	0.67	0.67	0.31	0.25
D4	0.36	0.52	0.56	0.86	0.88
D5	0.67	0.24	0.24	0.32	0.21
D6	0.77	0.60	0.56	0.31	0.33
D7	1.04	0.86	0.86	0.40	0.40

(Grup 1: Sham, **Grup 2:** İR Kontrol, **Grup 3:** UİÖK Kontrol, **Grup 4:** UİÖK+İR, **Grup 5:** UİÖK+Adenozin+İR)

Tablo 4.4: Gruplarda IL-8 değerleri

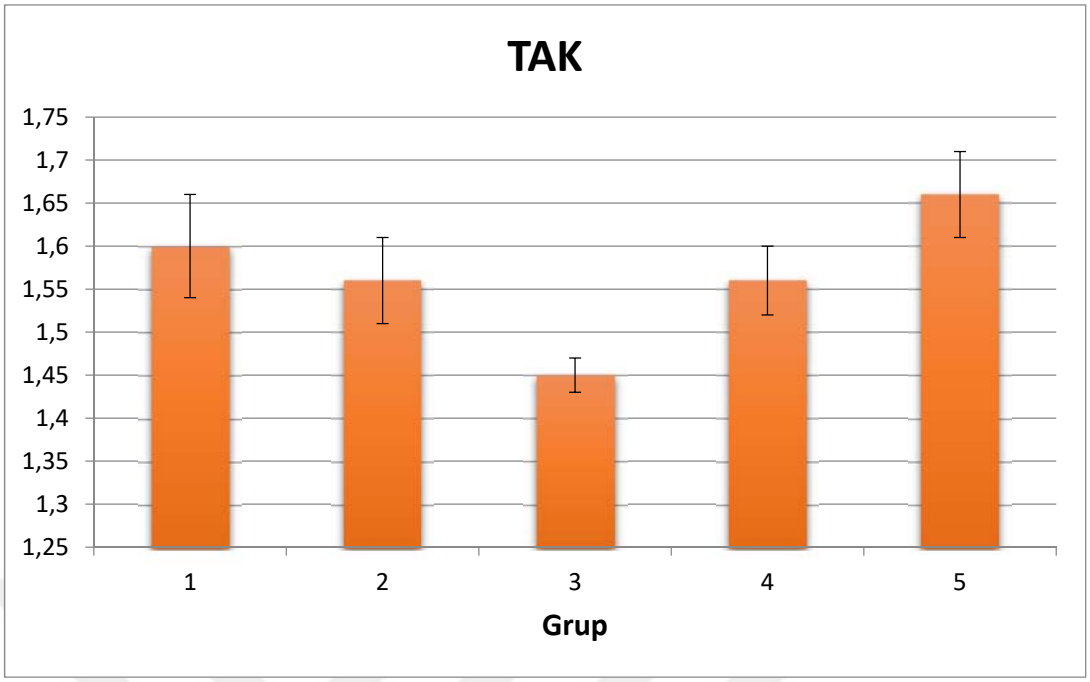
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 5
D1	2.78	3.02	3.07	3.20	3.02
D2	2.78	3.08	3.06	3.22	3.02
D3	2.83	3.05	3.17	3.23	2.82
D4	2.65	2.99	3.19	3.23	2.93
D5	2.72	3.12	3.17	3.18	3.02
D6	2.98	3.06	3.33	3.11	3.14
D7	2.85	2.95	3.30	3.33	3.18

(Grup 1: Sham, **Grup 2:** İR Kontrol, **Grup 3:** UİÖK Kontrol, **Grup 4:** UİÖK+İR, **Grup 5:** UİÖK+Adenozin+İR)

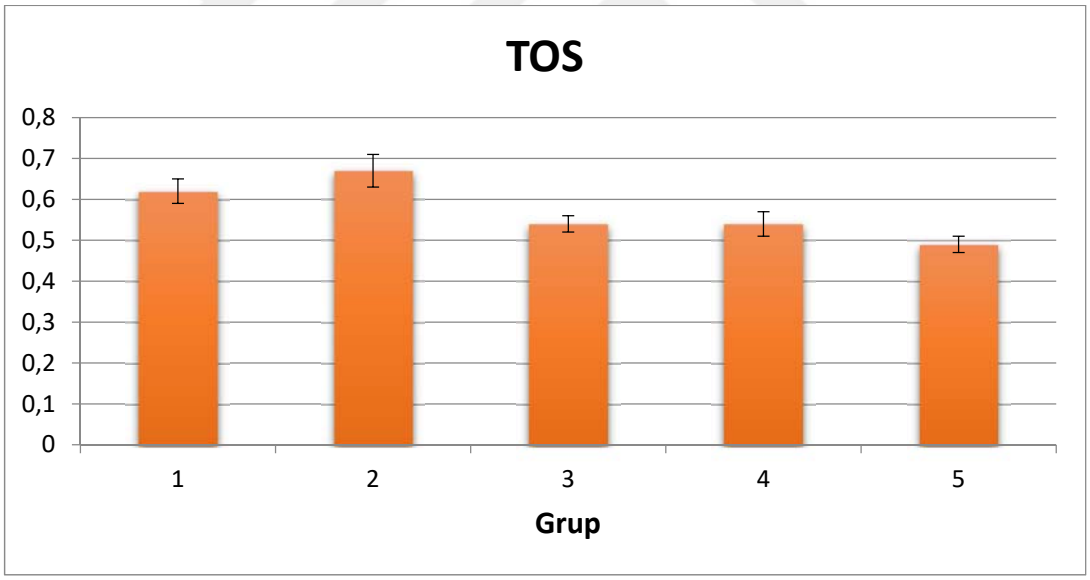
Tablo 4.5: Biyokimyasal verilerin istatiksel olarak karşılaştırılması

Değişkenler	Grup										
	1(n=7)		2(n=7)		3(n=7)		4(n=7)		5(n=7)		
	Ort.±SS	Ortanca (Min-Maks)	Ort.±SS	Ortanca (Min-Maks)	Ort.±SS	Ortanca (Min-Maks)	Ort.±SS	Ortanca (Min-Maks)	Ort.±SS	Ortanca (Min-Maks)	p değeri
TAK	1.60±0.16	1.61 (1.39-1.87)	1.56±0.14	1.61 (1.29-1.68)	1.45±0.06	1.42 (1.39-1.56)	1.56±0.11	1.57 (1.42-1.70)	1.66±0.13	1.70 (1.38-1.76)	0.065[b]
TOS	0.62±0.08	0.63 (0.51-0.74)	0.67±0.10	0.71 (0.51-0.78)	0.54±0.05	0.54 (0.47-0.60)	0.54±0.09	0.59 (0.40-0.63)	0.49±0.05	0.50 (0.41-0.58)	**0.005[b]**
TNF	0.68±0.24	0.67 (0.36-1.04)	0.75±0.37	0.68 (0.24-1.38)	0.71±0.34	0.68 (0.24-1.34)	0.57±0.29	0.41 (0.32-0.97)	0.54±0.31	0.41 (0.21-0.90)	0.751[b]
IL-8	2.80±0.10	2.79 (2.65-2.98)	3.04±0.06	3.05 (2.95-3.12)	3.19±0.11	3.18 (3.06-3.33)	3.22±0.06	3.22 (3.11-3.33)	3.02±0.12	3.02 (2.82-3.18)	**<0.001[a]**

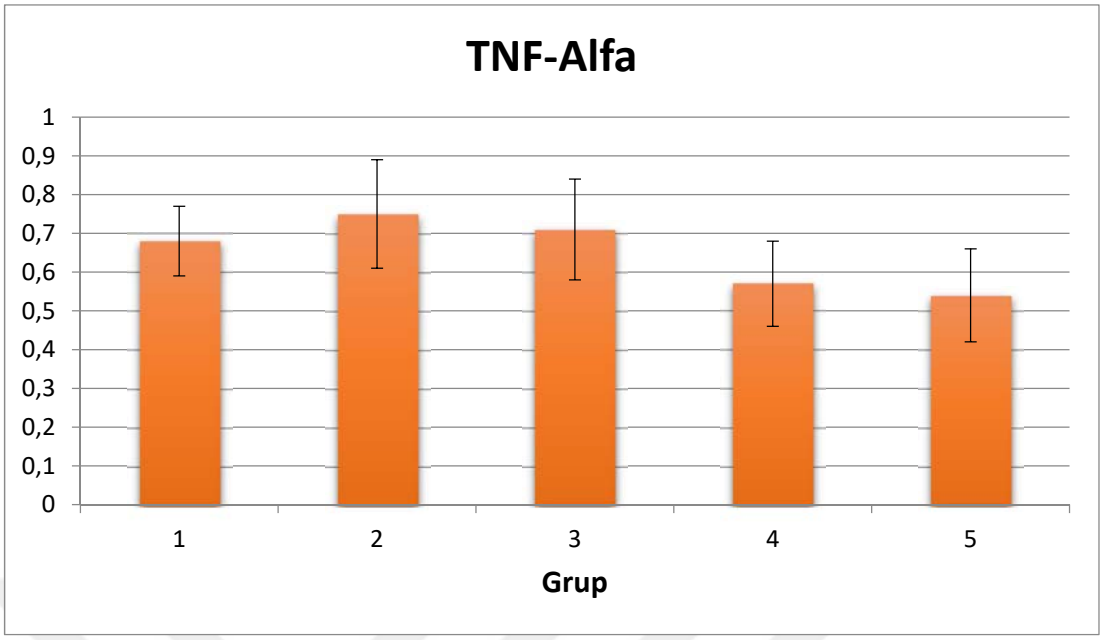
a: One Way ANOVA test, b: Kruskal Wallis test



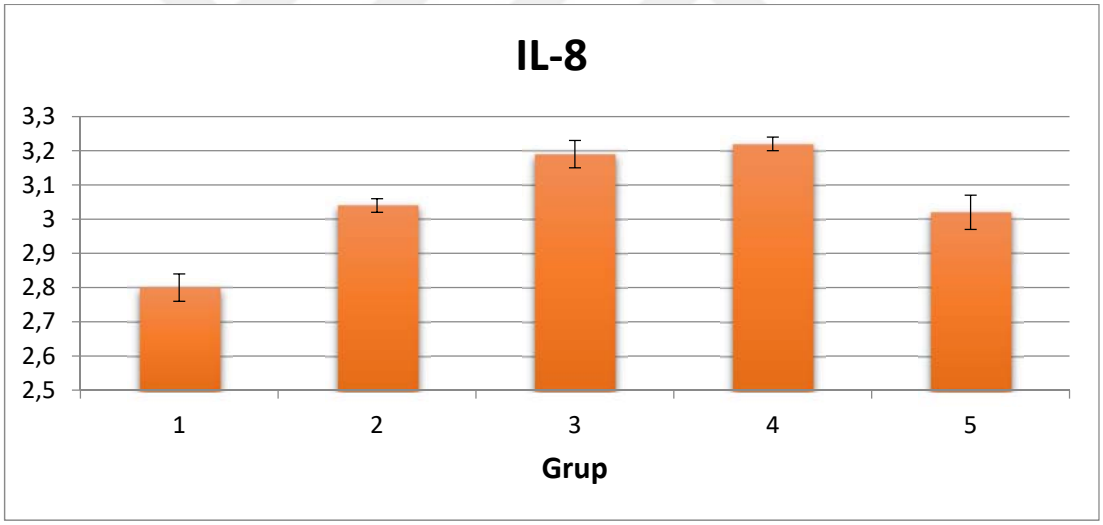
Grafik 4.1: Total antioksidan kapasite değerlerinin gruplara göre dağılımı



Grafik 4.2: Total oksidan stres değerlerinin gruplara göre dağılımı



Grafik 4.3: TNF-alfa değerlerinin gruplara göre dağılımı



Grafik 4.4: IL-8 değerlerinin gruplara göre dağılımı

4.2. Histopatolojik Bulgular

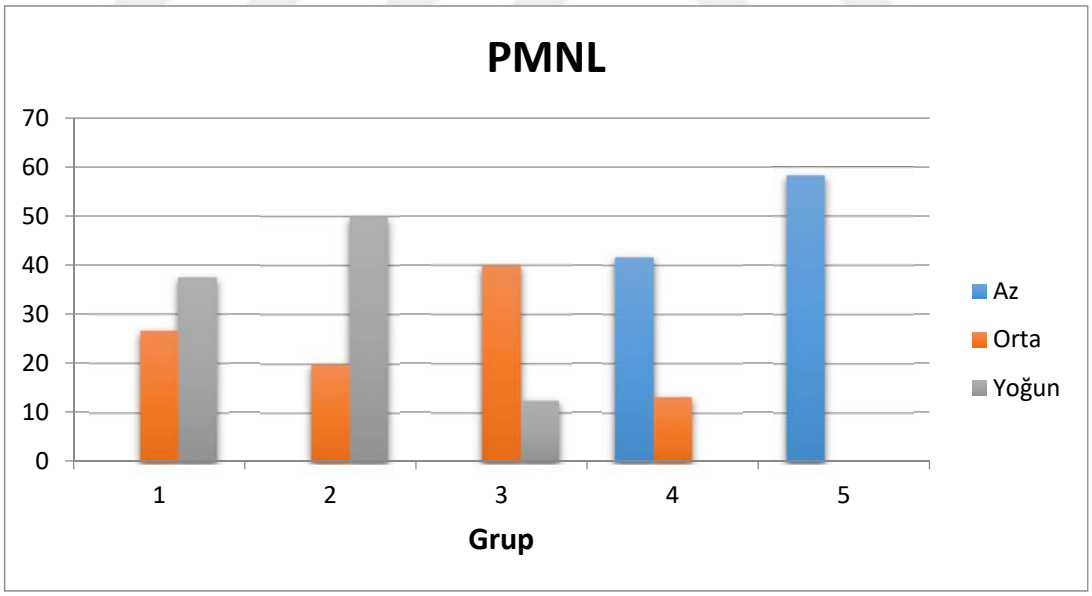
Tüm gruplarda inflamatuar hücre, ödem, nekroz varlığı hematoksilen – eozin boyamasında kesitlerde ayrı ayrı değerlendirilerek skorlandı. Hiç bir grupta nekroz görülmedi ve istatiksel değerlendirmeye alınmadı. Grup 1, Grup 2, Grup 3'te Grup 4 ve Grup 5'e göre istatiksel olarak anlamlı ölçüde farklılık mevcut olup ($p<0,001$), PMNL ve lenfosit yoğunluğu daha fazla görülmüştür. Ödem ise Grup 3, Grup 4 ve

Grup 5'te ilk iki gruba göre istatiksel olarak anlamlı ölçüde fazla görülmüştür (p<0,001).

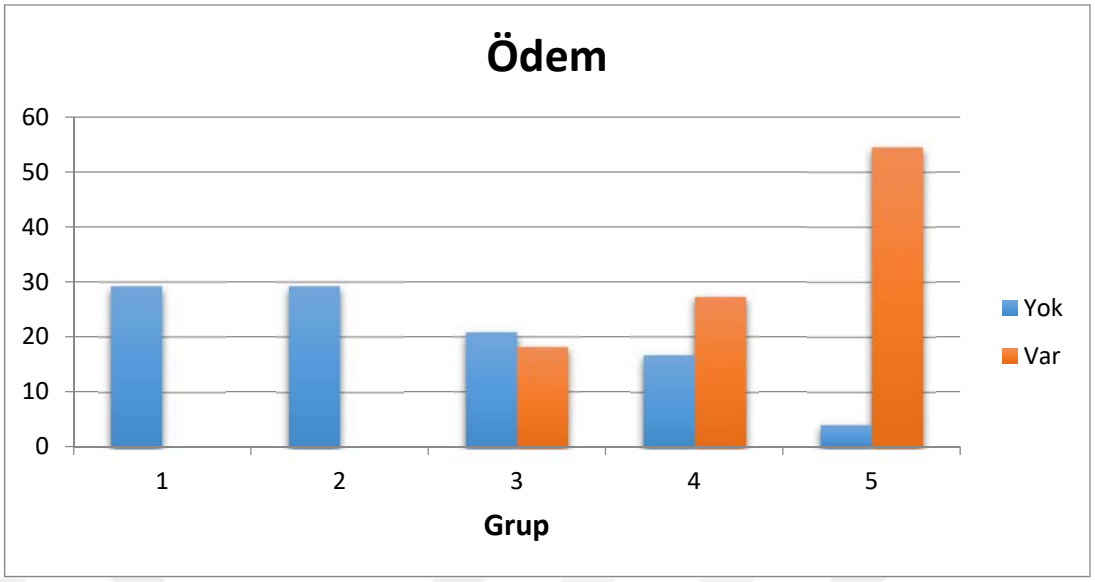
Tablo 4.6: Histopatolojik verilerin istatiksel olarak karşılaştırılması

Değişkenler		**Grup**					
		1	**2**	**3**	**4**	**5**	
		n(%)	**n(%)**	**n(%)**	**n(%)**	**n(%)**	**p değeri**
PMNL	**Az**	0(0.0)	0(0.0)	0(0.0)	5(41.7)	7(58.3)	
	Orta	4(26.7)	3(20.0)	6(40.0)	2(13.3)	0(0.0)	<0.001[b]
	Yoğun	3(37.5)	4(50.0)	1(12.5)	0(0.0)	0(0.0)	
Ödem	**Yok**	7(29.2)	7(29.2)	5(20.8)	4(16.7)	1(4.1)	<0.001[b]
	Var	0(0.0)	0(0.0)	2(18.2)	3(27.3)	6(54.5)	

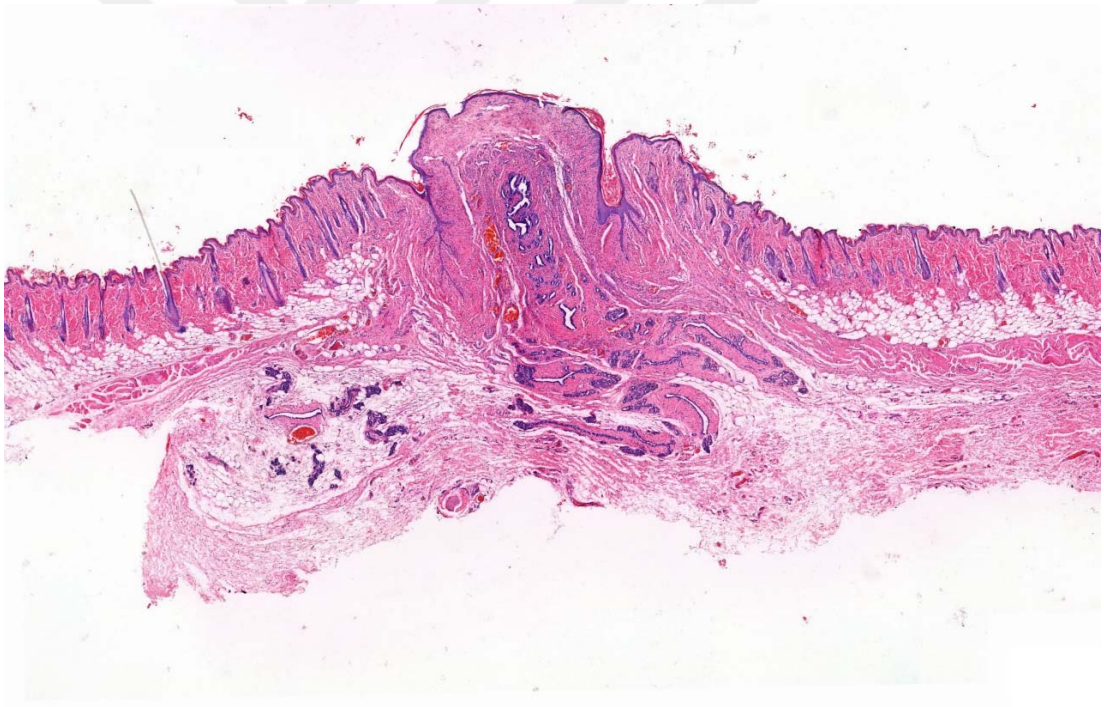
a: Ki-kare test, b: Fisher exact test
(Grup 1: Sham, **Grup 2:** İR Kontrol, **Grup 3:** UİÖK Kontrol, **Grup 4:** UİÖK+İR, **Grup 5:** UİÖK+Adenozin+İR)



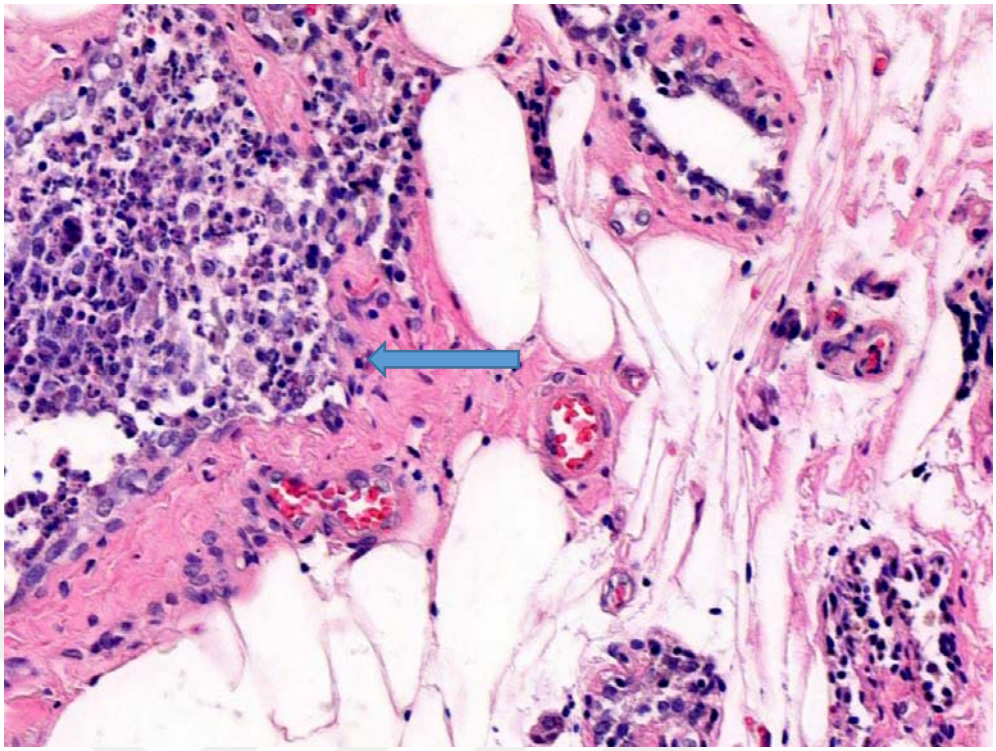
Grafik 4.5: PMNL değerlerinin gruplara göre dağılımı



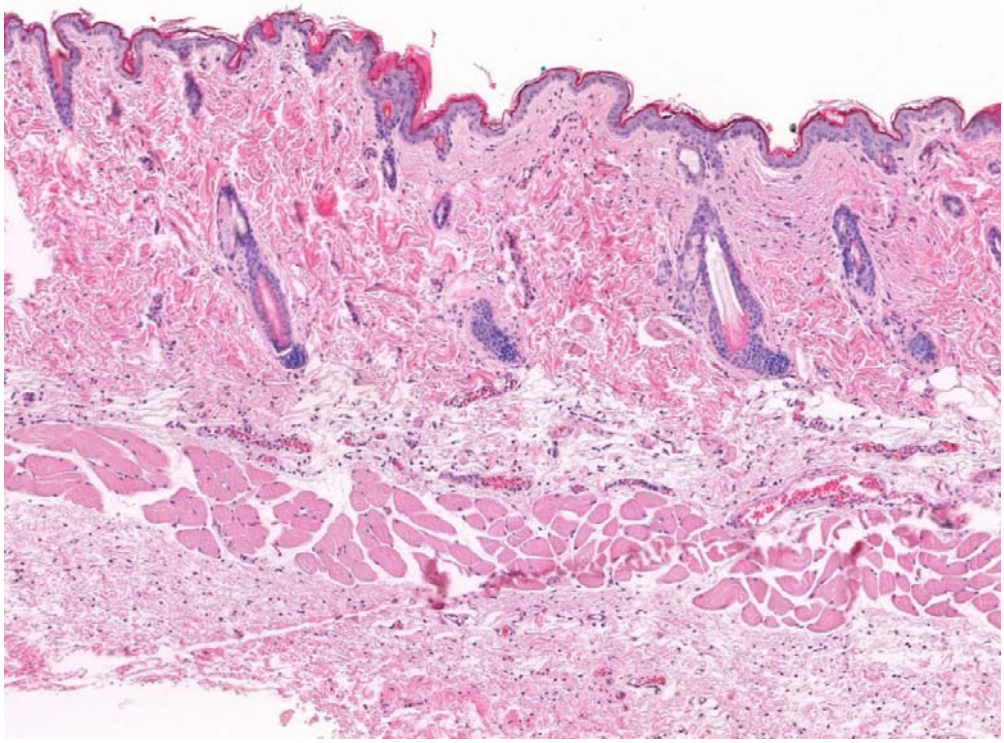
Grafik 4.6: Ödem yoğunluğunun gruplara göre dağılımı



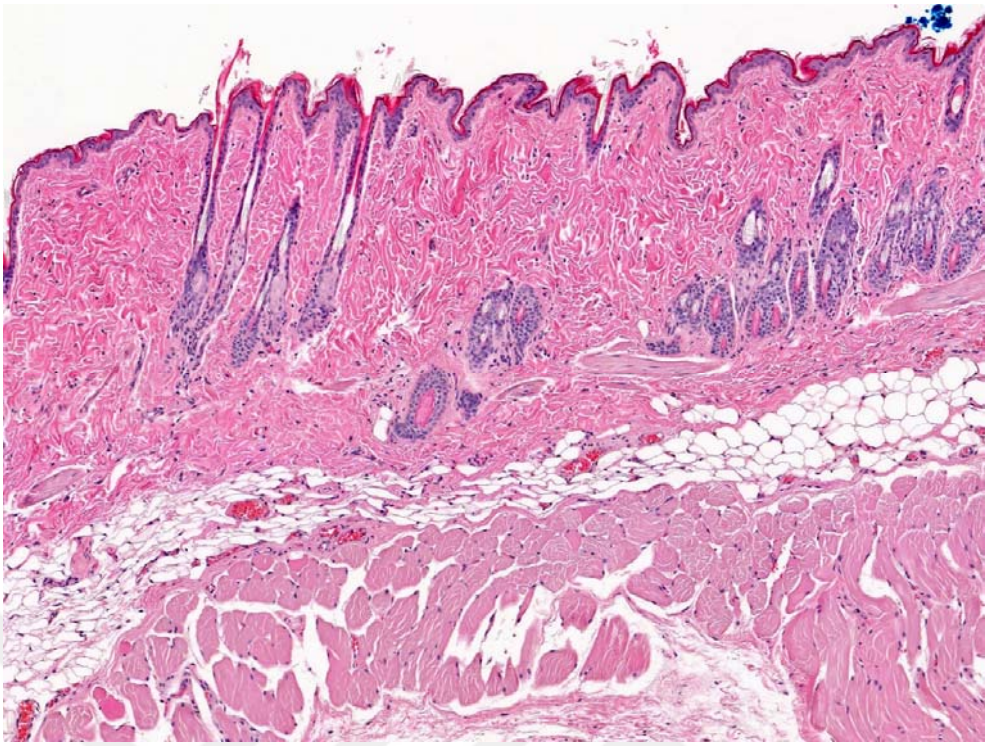
Şekil 4.1: Sham grubuna ait örnek, (H&E x20).



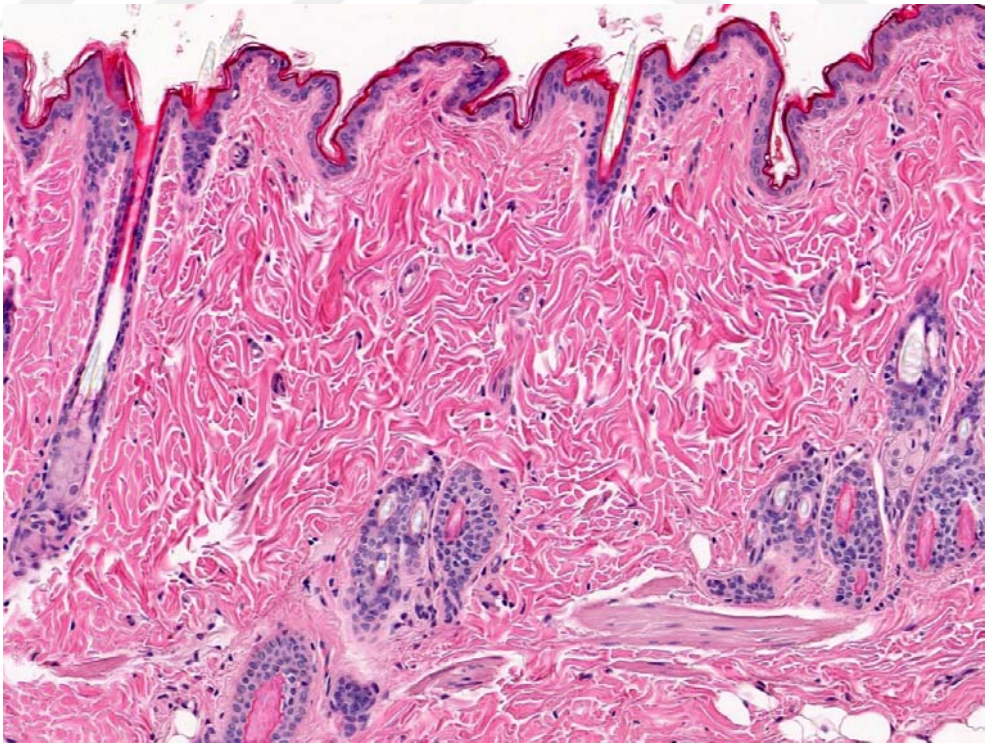
Şekil 4.2: İskemi reperfüzyon kontrol grubundan alınan kesite ait lamina propriada yoğun PMNL infiltrasyonu, (H&E x400, ok; PMNL infiltrasyonu).



Şekil 4.3: Uzak iskemik ön koşullanma+ iskemi reperfüzyon grubundan alınan kesite ait lamina propriada hafif PMNL infiltrasyonu, (H&E x100).



Şekil 4.4: Uzak iskemik ön koşullanma+ adenozin+ iskemi reperfüzyon grubundan alınan kesite ait lamina propriada hafif PMNL infiltrasyonu, (H&E x100).



Şekil 4.5: Uzak iskemik ön koşullanma+ adenozin+ iskemi reperfüzyon grubundan alınan kesite ait lamina propriada hafif PMNL infiltrasyonu, (H&E x200).

5. TARTIŞMA

Plastik cerrahide flepler uzun yıllardır kullanılmasına rağmen hala günümüzde flep kaybına bağlı komplikasyonlar büyük önem taşımaktadır. Bu kayıpların altta yatan önemli nedenlerinden birisi de iskemi reperfüzyon hasarıdır (16). Bu hasarı azaltmak amacıyla çeşitli yöntemler denenmektedir. Bunlardan bazıları iskemik ön koşullanma, uzak iskemik ön koşullanma ve farmakolojik ön koşullanmadır (2). Biz bu çalışmamızda flep yaşayabilirliğini direkt olarak etkileyen, klinikte karşılaşılan ve önemli bir sorun olan iskemi reperfüzyon hasarının azaltılması amacıyla uzak iskemik ön koşullanmanın ve uzak iskemik ön koşullanmanın adenozin ile birlikteliğinin etkinliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır.

Hipotez doğrultusunda her birinde 7 rat olan 5 grup oluşturuldu. Birinci grup sham grup olup bu grupta sadece flep elevasyonun etkisinin görülmesi amaçlandı. İkinci ve üçüncü gruplar ise kontrol grupları idi. Bu gruplardan ikinci grup iskemi reperfüzyon hasarını ön koşullanma yapılmaksızın görmeyi en fazla beklenen grup idi. Üçüncü grup ise uzak iskemik koşullanmanın kontrol grubu olup herhangi bir iskemi oluşturulmadı. Dördüncü grupta öncelikle uzak iskemik ön koşullanma yapıldı, ardından beşinci grup adenozin dozu ile aynı dozda serum fizyolojik intraperitoneal uygulanarak flep pedikülüne klemp konarak iskemi ve reperfüzyon oluşturuldu. Bu grupta uzak iskemik ön koşullanma oluşturmak için literatürde sıklıkla kullanılan bir model olan sol alt ekstremiteye 10 dakika iskemi 10 dakika reperfüzyon üç siklus şeklinde uygulandı (78, 79, 80). Daha önce Saita ve arkadaşları iskemi reperfüzyon hasarını engelleyen en etkili uzak iskemik ön koşullanma yönteminin üç kez uygulanan 10 dakika iskemi ve 10 dakika reperfüzyon şeklinde olduğunu bildirmişlerdir (80). Beşinci ve son grupta önce dördüncü gruba benzer şekilde uzak iskemik ön koşullanma yapıldı ve ardından 1mg/kg/i.p. adenozin yapılıp ardından flepte iskemi reperfüzyonu takiben flep distalinden örnekler alınarak histopatolojik ve biyokimyasal incelemeler yapıldı.

Çalışmada flep iskemi reperfüzyon modeli oluşturmak için rat inferior epigastrik arter flebi kullanıldı. Flep modeli oluşturmak için rat seçilmesindeki amaç kolay elde edilebilir olması, maliyetinin düşük olması ve daha önce yapılan çalışmalarda flep anatomik modelinin belirlenmiş olması idi. Karın derisinin

tamamının femoral sistemin dalı olan yüzeyel inferior epigastrik arterden sağlandığı bu model bir çok çalışmada ilk akla gelen flep modelidir (76). İlk olarak 1967 yılında Strauch ve Murray tarafından tanımlanmış olan inferior epigastrik flep diğer adıyla kasık flebi kolay hazırlanması nedeniyle de deneysel araştırmalarda yaygın olarak kullanılmaktadır (75). İlk tanımlandığı çalışmada 6x4 cm boyutlu flep diğer çalışmalarda farklı dörtgen şekillerde kullanılmıştır (76). 1984 yılında Petry ve Wortham tarafından farklı tasarımlar arasında ortaya çıkan tutarsızlıkları gidermek amacıyla flep lateral sınırı damar anatomisi ışığında belirlenmiştir (77). Bu bilgiler doğrultusunda belirlenmiş anatomik sınırlar içerisinde 3x6 cm flep hazırlandı. Bu fleplerde önemli bir sorun olan hayvanın ameliyat bölgesine zarar verme olasılığı, hayvanların operasyon bitimi örnek alınarak sakrifiye edilmelerinden dolayı bu çalışmada bir sorun teşkil etmedi.

Adenozinin güvenlik çalışmaları genelde 50-100 mcg/kg/dk dozlarında ve 5-10 dakikalık sürelerde yapılmıştır. Bilinen düzelmiş iskemik kalp hastalığı olan hastalarda bu dozlarda bile adenozin bolus enjeksiyonu kontraendikedir. Bu bağlamda adenozin sentetik reseptör agonistlerine tercih edilir. Çünkü sentetik reseptör agonistlerinin hızlı yıkılmamasına ek olarak hayvanlarda çok ciddi yan etkileri (ısrarlı hipotansiyon, bradikardi, bronkospazm) vardır. Papanastasiou ve arkadaşlarının 1999 yılında yaptıkları ve direkt olarak adenozin 1mg/kg intraperitoneal kullandıkları çalışmada bu doz güvenli bulunmuştur (79) ve bu çalışamada da bu doz tercih edilmiştir. Hiç bir grupta adenozin dozuna bağlı olarak bir komplikasyona veya ölüme rastlanmadı.

İskemi reperfüzyon hasarı, flep kaybına neden olan ve hastanın hastanede yatış süresini ve maliyetleri önemli ölçüde arttıran patofizyolojik olaylar dizisidir (18). Flep cerrahisinde iskemi reperfüzyon primer ve sekonder şeklide görülmekte ve sekonder iskemi reperfüzyon flebe daha fazla zarar vermektedir (22). İskemi reperfüzyon hasarında ortaya çıkan serbest oksijen radikalleri ve etkileri çeşitli hayvan modellerinde çalışılmıştır. İskemik ön koşullanma (İÖK) ise dokunun kısa aralıklarla iskemi ve reperfüzyona maruz bırakılarak dokunun uzun süreli iskemiye olan toleransını arttırma yöntemidir. İlk olarak 1986 yılında Murry ve arkadaşları, koroner arter üzerinde klempleme ile oluşturdukları kısa iskemik periyotları ve bunu takiben doku reperfüzyonları ile köpek miyokardında daha uzun bir iskemik periyoda

dayanıklılığın arttığını göstermişler ve iskemik ön koşullanma fenomenini tanımlamışlardır (49). İskemik ön koşullanmanın daha sonra farklı organlarda iskemi reperfüzyon hasarını önlemek amacıyla kullanıldığı bir çok çalışma mevcuttur.

Plastik cerrahide ise özellikle kas flepleri ve deri fleplerinde yapılan çalışmalar önem kazanmıştır. Mounsey ve ark. tarafından ilk kez domuz latissimus dorsi flebinde iskemik ön koşullanmanın iskemik hasarı azalttığını gösteren bir çalışma yapılmıştır (81). Gürcün ve ark. 2012 yılında rat iskelet kası iskemi reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullanma ve antioksidan olan N-asetilsisteinin iskelet kası üzerinde koruyucu olduğunu gösteren bir çalışma yapmıştır (78).

Przyklenk ve ark. 1993 yılında ise köpek miyokardında ilk kez uzak iskemik ön koşullanmanın iskemi reperfüzyon hasarını azalttığına yönelik bir çalışma yapmıştır (59). Küntscher ve ark. 2002 yılında akut uzak iskemik ön koşullanın rat kremasterik kas flebinde yaşayabilirliği arttırdığını gösteren bir çalışma yapmıştır. Bu çalışmada kontrol grubunda pediküle klemp konulmuş 2 saat iskemi sonrası 1 reperfüzyon yapılmış, uzak iskemik ön koşullanma için sol alt ekstremiteye 10 dakika iskemiyi takiben yarım saat reperfüzyon yapılmıştır (57). Yine Küntscher ve arkadaşları 2003 yılında rat epigastrik flebinde yaptıkları çalışmada NO'nun iskemik ön koşullanma ve uzak iskemik ön koşullanmaya eklenerek iskemik reperfüzyon hasarına olan etkinliğini araştırmışlar ve NO eklenmesinin flep yaşayabilirliğini arttırdığını göstermişlerdir (82).

Bu çalışmada adenozin seçilmesinin amacı UİÖK da önemli bir koruyucu olmasının yanı sıra antioksidan etkinliğinin olması ve daha önce yapılan çalışmalarda flep yaşayabilirliğini arttırdığının gösterilmiş olmasıdır (83). Adenozin klinik kullanımı olan, güvenli ve ciddi bir sistemik yan etkisi olmayan bir ajandır (84). Adenozinin iskemi reperfüzyon hasarından koruyucu etkisi özellikle çalışmalara konu olmaktadır. 1995 yılında Yokota ve arkadaşları domuz kalbinde yaptıkları çalışmada iskemik ön koşullanma ve adenozin ile yapılan farmakolojik ön koşullanmanın metabolik olarak aynı koruyucu etkinliği gösterdiğini göstermişlerdir (85).

İskemik ön koşullanmanın koruyucu etkinliği akut ve geç etki olmak üzere ikiye ayrılır. Akut faz dönemi 2 ila 4 saat arasında etkili iken, geç etki 24 ila 72 saat etkilidir. Akut dönemde adenozinin ön koşullanma için vazgeçilmez bir tetikleyici görevi vardır. Adenozin tarafından aktive edilen G proteinleri fosfolipaz C ve protein

kinaz C yi aktive eder ve aktive olan bu enzimler değişik hücre içi proteinleri fosforilleyerek iskemi reperfüzyon hasarını azaltır. Dacho ve arkadaşlarının 2012'de yaptıkları bir çalışmada adenozin iskemik ön koşullanma ile birlikte ve tek başına verilmesinin rat adipokutanöz fleplerde doku nekrozunu anlamlı ölçüde azaldığını göstermişlerdir. Bu çalışmada bizim çalışmamızda olduğu gibi yüzeyel inferior epigastrik flep kullanılmıştır. Gruplardan birine iki saat flep kaldırılıp bir şey yapılmamış, iskemik ön koşullanma amacıyla fleplere iki saat iskemi uygulanmıştır (86). Bu çalışmada da iskemik ön koşullanma modeli olarak iki saat iskemi süresi seçildi. Bu çalışmada bizim çalışmamızdan farklı olarak adenozin reseptör agonisti kullanılmış ve ilaç santral venöz kataterden infüzyon yolu ile verilmiştir. Bu çalışmada adenozin direkt olarak intraperitoneal olarak uygulandı. Polito ve arkadaşları yine bir adenozin reseptör agonisti olan polydeoksiribonükleotid kullanarak ratlarda iskemik fleplerde adenozinin doku perfüzyonunu arttırdığını göstermiştir (87). Bu çalışmada adenozin agonisti tekrarlayan dozlarda ve intraperitoneal yolla verilmiştir. Adenozinin iskemik ön koşullanmaya akut etkisinin incelenmesi amaçlandığı için tekrarlayan doz değil tek doz uygulaması tercih edildi.

Reperfüzyon döneminde oluşan serbest radikal hasarının büyüklüğünü total antioksidan kapasite, total oksidan stres ve inflamasyonda etkili faktör (TNF alfa, IL 8) düzeylerinin ölçümü ile gösterilmesi planlandı. Daha önceki iskemi-reperfüzyon çalışmalarında 2 veya 4 saat iskemi uygulanıp 12 veya 24 saatlik reperfüzyon sonrası biyokimyasal ölçümler yapılmıştır. Bu çalışmada da benzer şekilde 2 saatlik iskemi sonrası doku 2 saat reperfüze edildi. Alınan doku örneklerinden biyokimyasal olarak belirtilen parametreler ölçülmüştür.

Çalışmada uzak iskemik ön koşullanma yapılan ve uzak iskemik ön koşullanmaya adenozin eklenen ratlarda 2 saatlik reperfüzyon sonrası bakılan total antioksidan kapasite, total oksidan stres ve inflamasyonda etkili faktör (TNF alfa, IL 8) düzeyleri incelendi. Gruplar arasında total oksidan stres miktarı uzak iskemik ön koşullanmaya adenozin eklenen ratlarda iskemi reperfüzyon kontrol grubuna göre istatiksel olarak anlamlı ölçüde düşük bulundu ($p<0.001$). Total antioksidan kapasite ve TNF-alfa ölçümlerinde istatistiksel olarak anlamlı ($p< 0.05$) olacak şekilde herhangi bir fark saptanmadı. IL-8 değişkeni için de gruplar içinde istatiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edildi ($p<0.01$). Ancak bu veri IL-8'in sham grubunda en az olmasına

bağlı idi. Ancak bu veri ile IL-8'in en fazla olduğu UİÖK grubuna adenozin eklenmesinin IL-8'i azaltmaya yönelik etkisi gösterilmiş oldu. Çalışmada sham grubu dışındaki IL-8 en düşük değerlerin adenozin eklenen grupta olmasını iskemi reperfüzyon hasarını önleyici etkisi daha önceki çalışmalarda da gösterilen antioksidan özelliğine bağlı olabilir. Yine adenozin UİÖK'da tetiklenen humoral mediatörlerin etkisini arttırıp koruyuculuğu arttırmış olabilir. Çalışmada total antioksidan kapasite adenozin eklenen grupta en fazla bulunmuştur ve bu adenozinin antioksidan etkinliğini desteklemektedir. Hu ve arkadaşları, 2012 yılında rat serebral iskemi modelinde uzak iskemik ön koşullanma ve adenozin etkinliğini araştırmış ve inflamasyonun UİÖK ve adenozin gruplarında istatiksel olarak anlamlı ölçüde az olduğunu göstermişlerdir (8). Bu çalışmadan farklı olarak oksidan ve antioksidan parametreleri tek tek ölçülmüştür, ancak bu çalışmanın bulgularını destekler niteliktedir. Elde edilen TNF-alfa değerlerinde istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık elde edilmese de adenozin eklenen grupta en az seviyededir. Bunu destekleyen bir diğer çalışmada adenozin ile farmakolojik ön koşullanma ve uzak iskemik ön koşullanma ayrı ayrı gruplarda yapılarak her iki yöntemin de inflamasyonu ve oksidatatif hasarı azalttığı gösterilmiştir ve TNF-alfa seviyeleri istatistiksel olarak anlamlı ölçüde adenozin grubunda az bulunmuştur (79). Belki de inflamasyonda çok önemli olan TNF-alfa üzerine esas etkili faktör adenozindir ve bu hipotez doğrulanmak için ileri çalışmalara ihtiyaç duymaktadır.

Histolopatolojik olarak dejeneratif bulguları değerlendirmek için; inflamatuar hücre sayısı (PMNL), ödem varlığı ve nekroz araştırıldı. Bu bulgular içinde inflamatuar hücre (PMNL) sayısının uzak iskemik ön koşullanma yapılan ve uzak iskemik ön koşullanmaya adenozin eklenen ratlarda istatistiksel olarak daha az olduğu görüldü ($p<0.001$). Bu bulgu inflamatuar sitokinlerin de aynı gruplarda daha az saptanması ile açıklanabilmekte ve destekler niteliktedir. Ancak ödem, sham ve kontrol gruplarında deney gruplarına göre daha az saptandı ve istatiksel olarak anlamlı idi ($p<0.001$). Ödem istatiksel olarak deney gruplarında fazla olmasına rağmen oluşan ödemin skorlamada az yoğun olduğunu, ancak diğer gruplarda hiç ödem saptanmaması nedeniyle var yok şeklinde değerlendirmeye alındığını ve bu anlamlı farkın saptandığını vurgulamak isteriz. Bu sonuçta denek sayısının kısıtlı olması da önemli bir faktördür. Daha çok denekle çalışılması çalışmanın duyarlılığı arttırabilir. Yine

adenozin ve uzak iskemik ön koşullanmanın ayrı ayrı incelendiği gruplarda ödem ile ilgili veriler çok kısıtlı olup ileri çalışmalara ihtiyaç duyulmaktadır. Her dokuda farklılık gösteren ve iskemiye gösterilen maksimum toleransı gösteren süreye kritik iskemi süresi adı verilmektedir. Bu süre deri için yaklaşık olarak 24 saattir (88). Nekroz bu süreyi aşan iskemilerde görülmekle birlikte bu çalışmada maksimum iskemi süresi 2 saat olup bu durum çalışmamızda hiç bir örnekte nekroz görülmemesini açıklamaktadır.

6. SONUÇLAR

Sıçan yüzeyel inferior epigastrik flebinde oluşturulan deri flep modelinde uzak iskemik ön koşullanma ve uzak iskemik ön koşullanmaya eklenen adenozinin flep yaşayabilirliği üzerine olan etkisinin araştırıldığı bu deneysel çalışmada elde edilen sonuçlar şu şekilde özetlenebilir:

1. Uzak iskemik ön koşullanma grubunda histopatolojik verilerden inflamatuar hücre düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı oranda koruyucu yönde fark bulunmuştur.
2. Uzak iskemik ön koşullanmaya adenozin eklenen grupta biyokimyasal verilerden total oksidan stres seviyelerinde, histopatolojik verilerden inflamatuar hücre düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı oranda koruyucu yönde fark bulunmuştur.
3. Her iki grupta da istatiksel olarak anlamlı ölçüde ödem fazla görülmüştür.
4. Her iki grupta TNF-alfa, total antioksidan kapasite, nekroz açısından istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Çalışmadan elde edilen bu sonuçlara göre hastanede kalış süresi, maliyetler ve morbiditeye neden olan iskemi – reperfüzyon hasarı ve sonucundaki flep nekrozlarından kısmen koruyucu etkileri görülmekle birlikte yapılacak daha geniş çalışmalar yöntem hakkında daha fazla bilgiye ulaşılmasını sağlayacaktır.

ÖZET

Rat Flep İskemi Reperfüzyon Modelinde Uzak İskemik Ön Koşullanma ve Uzak İskemik Ön Koşullanmaya Eklenen Adenozin'in Etkinliğinin Araştırılması

Amaç: Flep yaşayabilirliğinde önemli bir problem olan iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesine yönelik günümüzde bir çok yöntem denenmektedir. Adenozin doğal bir nükleozid olup vücudumuzda bir çok fizyolojik olayda sentezlenip kullanılmaktadır. Adenozinin iskemi, hipoksi ve travma gibi durumlarda üretimi artar ve önemli bir lokal düzenleyici görev üstlenir, ayrıca güçlü bir antioksidandır. Bu çalışmada klinikte karşılaştığımız önemli bir sorun olan iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesi amacıyla uzak iskemik ön koşullanmanın ve uzak iskemik ön koşullanmanın adenozin ile birlikteliğinin etkinliğini araştırılmıştır.

Yöntem: Hayvanlar randomize olarak her bir grupta 7 hayvan olacak şekilde öncelikle 5 gruba ayrıldı. Ratın karnında medialde orta hat çizilerek yukarıda ksifoidi aşağıda simfizis pubisi ve lateralde arka aksiller çizgiyi geçmeyecek şekilde 3x6 cm boyutlarında epigastrik flep planlandı. İlk grup sham grup olup herhangi bir işlem yapılmadı. İkinci grup iskemi reperfüzyon kontrol grubu olup bu grupta iskemi oluşturmak için pediküle mikroklemp konarak iki saat iskemi ardından iki saat reperfüzyon sağlandı. Üçüncü grup uzak iskemik ön koşullanma grubu olup bu grupta sol alt ekstremiteye 10'ar dakika iskemi 10'ar dakika reperfüzyon 3 kez uygulandı. Dördüncü grupta üçüncü grup ardından ikinci gruptaki işlemler tekrar edildi. Son grupta ise dördüncü gruptan farklı olarak iki işlem arasında 1mg/kg dozunda intraperitoneal adenozin yapıldı. Tüm gruplarda total çalışma süresi sonunda anestezi altındaki ratlardan biyokimyasal ve histopatolojik inceleme amacıyla örnekler alındı ve deney protokolu sona erince yüksek doz anestezik madde uygulanarak ratlar sakrifiye edildi.

Bulgular: Uzak iskemik ön koşullanma grubunda histopatolojik verilerden inflamatuar hücre düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı oranda koruyucu yönde fark bulunmuştur ($p<0.001$). Uzak iskemik ön koşullanmaya adenozin eklenen grupta biyokimyasal verilerden total oksidan stres seviyelerinde ($p:0.005$), histopatolojik verilerden inflamatuar hücre düzeyinde istatistiksel olarak anlamlı oranda koruyucu yönde fark bulunmuştur ($p<0.001$). Her iki grupta da istatiksel olarak anlamlı ölçüde kontrol gruplarına göre ödem fazla görülmüştür ($p<0.001$). Her iki grupta TNF-alfa, total antioksidan kapasite, nekroz açısından istatiksel olarak anlamlı bir fark saptanmamıştır.

Sonuç: Uzak iskemik ön koşullanma ve uzak iskemik ön koşullanmaya adenozin eklenen grupta iskemi – reperfüzyon hasarı ve flep yaşayabilirliği üzerinde olumlu etkileri görülmüştür. Ancak yapılacak daha geniş kapsamlı çalışmalar yöntemin ve bu maddenin etkileri hakkında daha fazla bilgiye ulaşılmasını sağlayacaktır.

Anahtar Sözcükler: Adenozin, flep, iskemi reperfüzyon, ön koşullanma, uzak iskemik ön koşullanma.

SUMMARY

The Effects of Remote Ischaemic Preconditioning and Adenosine With Remote Ischaemic Preconditioning in Rat Flap Ischaemia Reperfusion Injury Model

Aim: Many methods are currently being tried to prevent ischemia reperfusion injury, an important problem in flap viability. Adenosine is a natural nucleoside that is synthesized and used in many physiological events in our body. Adenosine increases production in cases such as ischemia, hypoxia and trauma and plays an important local regulatory role, as well as a strong antioxidant. The efficacy of remote ischemic preconditioning and remote ischemic preconditioning with adenosine in order to prevent ischemia reperfusion injury, was investigated an important problem is encountered clinically in this study.

Methods: Animals were randomly assigned into 5 groups, with 7 animals in each group. Medial midline in the abdomen of the rat was planned and epigastric flap was planned in 3x6 cm size so that the xyphoid was below the symphysis pubis and the posterior axillary line did not pass laterally. The first group, sham group and no procedure was performed. The second group is ischemia reperfusion control group, in which pedicle microclamping was performed to create ischemia and two hours of ischemia followed by two hours of reperfusion. The third group was remote ischemic preconditioning group in which the left lower extremity was subjected to 10 minutes of ischemia and 10 minutes of reperfusion 3 times. In the fourth group, the third group was followed by the second group. In the last group, 1 mg / kg intraperitoneal adenosine was administered between the two treatments, unlike the fourth group. At the end of the total study period, samples were taken from the anesthetized rats for biochemical and histopathologic examination and after the end of the experimental protocol, the rats were sacrificed by applying high dose anesthetic agent.

Results: A statistically significant protective difference was found in inflammatory cell level in the remote ischemic preconditioning group ($p<0.001$). In the adenosine with remote ischaemic preconditioning group total antioxidant capacity levels ($p:0.005$) and in inflammatory cells ($p<0.001$) statistically significant difference was found in protective effect. There was a statistically significant increase in edema in both groups compared to control groups ($p<0.001$). There was no statistically significant difference in TNF-alpha, total antioxidant capacity, necrosis in both groups.

Conclusion: Remote ischaemic preconditioning and adenosine with remote ischaemic preconditioning had benefical effect on ischaemia – reperfusion injury and flap survival in skin flaps. However, further studies with this method and adenosine will help us to get more information about the effects.

Keywords: Adenosine, flap, ischaemia reperfusion, preconditioning, remote ischaemic preconditioning.

KAYNAKLAR

1) Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: A review in relation to free tissue transfers. Microsurgery. 2004; 24: 468-475.

2) Harder Y, Amon M, Laschke MW, Schramma R, Rücker M, Wettstein R, Bastiaanse J, Frick A, Machens HG, Küntscher M, Germann G, Vollmar B, Erni D, Menger MD. An old dream revitalised: Preconditioning strategies to protect surgical flaps from critical ischaemia and ischaemia-reperfusion injury. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2008; 61: 503-511.

3) Facundo HT, Carreira RS, de Paula JG, Santos CC, Ferranti R, Laurindo FR, Kowaltowski AJ. Ischemic preconditioning requires increases in reactive oxygen release independent of mitochondrial K^+ channel activity. Journal of Free Radicals in Biology & Medicine. 2006; 40: 469–479.

4) Randhawa PK, Bali A, Jaggi AS. RIPC for multiorgan salvage in clinical settings: Evolution of concept, evidences and mechanisms. European Journal of Pharmacology. 2015; 746: 317–332.

5) Hasko G, Cronstein BN. Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity. Trends in Immunology. 2004; 25: 33-39.

6) Woolfson RG, Millar CGM, Neild GH. Ischaemia and reperfusion injury in the kidney: Current status and future direction. Nephrology Dialysis Transplantation. 1994: Editorial Comments.

7) Manintveld OC, te Lintel Hekkert M, Keijzer E, Verdouw PD, Duncker DJ. Intravenous adenosine protects the myocardium primarily by activation of a neurogenic pathway. British Journal of Pharmacology. 2005; 145: 703–711.

8) Hu S, Dong H, Zhang H, Wang S, Hou L, Chen S, Zhang J, Xiong L. Noninvasive limb remote ischemic preconditioning contributes neuroprotective effects via activation of adenosine A_1 receptor and redox status after transient focal cerebral ischemia in rats. Brain Research. 2012; 1459: 81–90.

9) Peralta C, Hotter G, Closa D, Prats N, Xaus C, Gelpi E, Rosello-Catafau J. The protective role of adenosine in inducing nitric oxide synthesis in rat liver ischemia preconditioning is mediated by activation of adenosine A_2 receptors. Hepatology. 1999; 29: 126–132.

10) Daniel RK, Kerrigan CL. Skin flaps: An anatomical and hemodynamic approach. Clinics in Plastic Surgery. 1979; 6: 181-200.

11) Vedder N.B. Flap physiology. In: Mathes SJ, esd. Mathes Plastic Surgery, 2nd edition. Philadelphia: Saunders Elsevier Inc, 2006: Vol: 1; 483-506.

12) Daniel RK, Kerrigan CL. Principle and physiology of skin flap surgery. In: McCarthy JG, eds. Plastic Surgery. Philadelphia: WB. Saunders, 1990: 275-328.

13) Kim KZ, Thompson DH, George TF. Effect of anemia on survival of myocutaneous flaps in the pig. Otolaryngolgy Head Neck Surgery. 1994; 1: 509-512.

14) Burnstock G, Ralevic V. New insights into the local regulation of blood flow by perivascular nerves and endothelium. British Journal of Plastic Surgery. 1994; 47: 527-543.

15) Banbury J, Siemionow M, Porvasnik S, Petras S, Zins JE. Muscle flaps triphasic microcirculatory response to sympathectomy and denervation. Plastic and Reconstructive Surgery. 1999; 104: 730-737.

16) van den Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A, van der Hulst RRWJ, R.R. Review: Ischaemia-reperfusion injury in flap surgery. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2009; 62: 721–726.

17) Arslan E, Basterzi Y, Aksoy A, Majka C, Sari A, Demirkan F. The additive effects of carnitine and ascorbic acid on distally burned dorsal skin flap in rats. Medical Science Monitor. 2005; 11: 176-180.

18) Kerrigan CL, Stotland MA. Ischemia reperfusion injury: a review. Microsurgery. 1993; 14: 165- 175.

19) Çetin C, Köse AA, Aral E, Çolak Ö, Erçel C, Karabağlı Y, Özyılmaz M, Alataş Ö, Eker A. Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: Experimental study in rat epigastric island flaps. Annals of Plastic Surgery. 2001; 47: 540-546.

20) Kuo YR, Wang FS, Jeng SF, Lutz BS, Huang HC, Yang KD. Nitrosoglutathione promotes flap survival via suppression of reperfusion injury-induced superoxide and inducible nitric oxide synthase induction. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 2004; 57: 1025-1031.

21) Stokfisz K, Polak AL, Zagorski M, Zielinska M. Ishaemic preconditioning – Current knowledge and potential future applications after 30 years of experience. Advances in Medical Sciences. 2017: 62: 307-316.

22) Shin MS, Angel MF, Im MJ, et al. Effects of 21-aminosteroid U74389F on skin-flap survival after secondary ischemia. Plastic and Reconstructive Surgery. 1994; 94: 661-666.

23) Özmen S, Ayhan S, Demir Y, Siemionow M, Atabay K. Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery. 2008; 61: 939-948.

24) Kakita T, Suzuki M, Takeuchi H, Unno M, Matsuno S. Significance of xanthine oxidase in the production of intracellular oxygen radicals in an in-vitro hypoxia-reoxygenation model. Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. 2002; 9: 249-255.

25) Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, Hoopes JE. Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. Annals of Surgery. 1985; 201: 357-359.

26) Tangney CC, Hankins JS, Murtaugh MA, Piccione W. Plasma vitamins E and C concentrations of adult patients during cardiopulmonary bypass. The Journal of the American College of Nutrition. 1998; 17: 162-170.

27) Çoban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: An experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. Mediators of Inflammation. 2005; 2005: 304-308.

28) Ramires PR, Ji LL. Glutathione supplementation and training increases myocardial resistance to ischemia-reperfusion in vivo. American Journal of Physiolog Heart and Circulatory Physiology. 2001; 281: 679-688.

29) De Celle T, Heeringa P, Strzelecka AE, Bast A, Smits JF, Janssen BJ. Sustained protective effects of 7-monohydroxyethylrutoside in an in vivo model of cardiac ischemia-reperfusion. European Journal of Pharmacology. 2004; 494: 205-212.

30) Weinbroum AA, Kidron A, Hochhauser E, Hochman AH, Rudick V, Vidne BA. Liver glutathione level influences myocardial reperfusion injury following liver ischemia-reperfusion. Medical Science Monitor. 2001; 7: 1137-1144.

31) Rhoden EL, Pereira-Lima L, Teloken C, Lucas ML, Bello-Klein A, Rhoden CR. Beneficial effect of alpha-tocopherol in renal ischemia-reperfusion in rats. The Japanese Journal of Pharmacology. 2001; 87: 164-166.

32) Zaccaria A, Weinzweig N, Yoshitake M, Matsuda T, Cohen M. Vitamin C reduces ischemia-reperfusion injury in a rat epigastric island skin flap model. Annals of Plastic Surgery. 1994; 33: 620-623.

33) Çetinkale O, Bilgiç L, Bolayirli M, Şengül R, Ayan F, Burçak G. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. Plastic and Reconstructive Surgery. 1998; 102: 153-160.

34) Mittermayr R, Valentini D, Fitzal F, Hallström S, Gasser H, Redl H. Protective effect of a novel NO-donor on ischemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model. Wound Repair and Regeneration. 2003; 11: 3-10.

35) Xu DZ, Lu Q, Kubicka R, Deitch EA. The effect of hypoxia/reoxgenation on the cellular function of intestinal epithelial cells. Journal of Trauma and Acute Care Surgery. 1999; 46: 280-285.

36) Zimmerman BJ, Granger DN. Reperfusion injury. Surgical Clinics of North America. 1992; 72: 65-83.

37) Wilhelm J. Metabolic aspects of membrane lipid peroxidation. Acta Universitatis Carolinae Medica Monographia. 1990; 137:1-53.

38) Green CJ, Gower JD, Healing G, Cotterill LA, Fuller BJ, Simpkin S. The importance of iron, calcium and free radicals in reperfusion injury: An overview of studies in ischaemic rabbit kidneys. Free Radical Research Communications. 1989; 7: 255-264.

39) Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: A reevaluation. American Journal of Physiology. 1988; 254: 768-774.

40) Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Cellular Responses to Stress and Toxic Insults: Adaptation, Injury, and Death. In: Kumar V, Abbas AK, Aster JC, eds. Robbins and Cotran Pathologic Basis of Disease, 9 th ed. Philadelphia: WB. Saunders Company, 2015: 31-68.

41) Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: Strategies to inhibit complement. Fundamental & Clinical Pharmacology. 2001; 15: 293-306.

42) Reiter RJ. Oxidative processes and antioxidant defense mechanisms in the aging brain. The FASEB Journal. 1995; 9: 526-533.

43) Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. British Medical Bulletin. 2004; 70: 71-86.

44) Woodfin A, Voisin MB, Nourshargh S. PECAM-1: A multi-functional molecule in inflammation and vascular biology. Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology. 2007; 27: 2514-2523.

45) Bagge U, Amundson B, Lauritzen C. White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. Acta Physiologica Scandinavica. 1980; 108: 159-163.

46) García-Villalón AL, Amezquita YM, Monge L, Fernández N, Salcedo A, Diéguez G. Endothelin-1 potentiation of coronary artery contraction after ischemia reperfusion. Vascular Pharmacology. 2008; 48:109-114.

47) Sener G, Sakarcan A, Yegen BC. Role of garlic in the prevention of ischemia reperfusion injury. Molecular Nutrition & Food Research. 2007; 51: 1345-1352.

48) Cherubini A, Ruggiero C, Morand C, Lattanzio F, Dell'aquila G, Zuliani G, Di Iorio A, Andres-Lacueva C. Dietary antioxidants as potential pharmacological agents for ischemic stroke. Current Medicinal Chemistry. 2008; 15: 1236-1248.

49) Murry CE, Jennings RB, Reimer KA. Preconditioning with ischemia: A delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. Circulation. 1986; 74: 1124-1136.

50) Cohen MV, Baines CP, Downey JM. Ischemic preconditioning: From adenosine receptor of KATP channel. Annual Review of Physiology. 2000; 62: 79-109.

51) Pang CY, Yang RZ, Zhong A, Xu N, Boyd B, Forrest CR. Acute ischaemic preconditioning protects against skeletal muscle infarction in the pig. Cardiovascular Research. 1995; 29: 782-788.

52) Hotter G, Closa D, Prados M, Fernández-Cruz L, Prats N, Gelpí E, Roselló-Catafau J. Intestinal preconditioning is mediated by a transient increase in nitric oxide. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996; 222: 27-32.

53) Peralta C, Closa D, Hotter G, Gelpí E, Prats N, Roselló-Catafau J. Liver ischemic preconditioning is mediated by the inhibitory action of nitric oxide on endothelin. Biochemical and Biophysical Research Communications. 1996; 229: 264-270.

54) Du ZY, Hicks M, Winlaw D, Spratt P, Macdonald P. Ischemic preconditioning enhances donor lung preservation in the rat. The Journal of Heart and Lung Transplantation. 1996; 15: 1258-1267.

55) Turman MA, Bates CM. Susceptibility of human proximal tubular cells to hypoxia: Effect of hypoxic preconditioning and comparison to glomerular cells. Renal Failure. 1997; 19: 47-60.

56) Kanoria S, Jalan R, Seifalian AM, Williams R, Davidson BR. Protocols and mechanisms for remote ischemic preconditioning: A novel method for reducing ischemia reperfusion Injury. Transplantation. 2007; 84: 445- 458.

57) Przyklenk K, Bauer B, Ovize M, Kloner RA, Whittaker P. Regional ischemic 'preconditioning' protects remote virgin myocardium from subsequent sustained coronary occlusion. Circulation. 1993; 87: 893-899.

58) Küntscher MV, Schirmbeck EU, Menke H, Klar E, Gebhard MM, Germann G. Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model. Plastic and Reconstructive Surgery. 2002; 109: 2398-2404.

59) Küntscher MV, Kastell T, Sauerbier M, Nobiling R, Gebhard MM, Germann Günter. Acute remote ischemic preconditioning on a rat cremasteric muscle flap model. Microsurgery. 2002; 22: 221-226.

60) Stein HJ, Fayman MS, Oosthuizen MM, Hinder RA. Verapamil improves survival of rat hyperemic island skin flaps. Surgery. 1989; 106: 617-623.

61) Matsumura H, Yoshizawa N, Watanabe K, Vedder NB. Preconditioning of the distal portion of a rat random-pattern skin flap. British Journal of Plastic Surgery. 2001; 54: 58-61.

62) Fredholm BB, IJzerman AP, Jacobson KA, Klotz KN, Linden J. International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and classification of adenosine receptors. Pharmacological Reviews. 2001; 53: 527-552.

63) Drury AN, Szent-Györgyi A. The physiological activity of adenine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. The Journal of Physiology. 1929; 68: 213–237.

64) Ralevic V, Burnstock G. Receptors for purines and pyrimidines. Pharmacological Reviews. 1998; 50: 413–492.

65) Feldman RS, Meyer JS, Quenzer LF. Stimulants: nicotine and caffeine. In: Principles of Neuropsychopharmacology. Massachusetts: Sinauer Associates Inc., 1997: 616-624.

66) Kayır H, Uzbay T. Santral adenozinerjik sistem ve klinik önemi. Klinik Psikofarmakoloji Bülteni. 2004; 14: 159-67.

67) Broch OJ, Ueland PM. Regional and subcellular distribution of S-adenosylhomocysteine hydrolase in the adult rat brain. Journal of Neurochemistry. 1980; 35: 484-488.

68) Fredholm BB, Fried G, Hedqvist P. Origin of adenosine released from rat vas deferens by nerve stimulation. European Journal of Pharmacology. 1982; 79: 233-243.

69) Lloyd HGE, Fredholm BB. Involvement of adenosine deaminase and adenosine kinase in regulating extrcellular adenosine concentration in rat hippocampal slices. Neurochemistry International. 1995; 26: 387-395.

70) Ribeiro JA, Sebastiao AM, de Mendonca A. Adenosine receptors in the nervous system: Pathophysiological implications. Progress in Neurobiology. 2003; 68: 377-392.

71) Dunwiddie TV, Masino SA. The role and regulation of adenosine in the central nerveus system. Annual Review of Neuroscience. 2001; 24: 31-55.

72) Stambaugh K, Jacobson KA, Jiang JL, Liang BT. A novel cardio protective function of adenosine A_1 and A_3 receptors during prolonged simulated ischemia.

American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology. 1997; 273: 501-505.

73) Şengül İ, Şengül D. İskemik ön koşullanma ve sonradan koşullanma mekanizmaları olarak intraselüler sinyalizasyon ve adenozin. Cumhuriyet Tıp Dergisi. 2010; 32: 127-131.

74) Miyawaki H, Ashraf M. Ca_2^+ as a mediator of ischemic preconditioning. Circulation Research. 1997; 80: 790-794.

75) Strauch B, Murray DE. Transfer of composite graft with immediate suture anastomosis of its vascular pedicle measuring less than 1 mm in its external diameter using microsurgical techniques. Plastic and Reconstructive Surgery. 1967; 40: 325.

76) Bayramiçli M. Deneysel Mikrocerrahi. İstanbul: Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret AŞ., 2005. Bölüm 5.1, sayfa 467 - 468.

77) Petry JJ, Wortham KA. The anatomy of the epigastric flap in the experimental rat. Plastic and Reconstructive Surgery. 1984; 74: 410-414.

78) Gürcün U, Kurtoğlu T, Dişçigil B, Özkısacık E, Boğa M, Yenisey Ç. Sıçan iskelet kası iskemi-reperfüzyon modelinde iskemik ön koşullama ve N-asetilsistein: Antioksidan tedavi iskemik ön koşullamayı etkiliyor mu? Türk Göğüs Kalp Damar Cerrahisi Dergisi. 2012; 20: 862-868.

79) Papanastasious S, Estdale SE, Homer-Vanniasinkam S, Mathie RT. Protective effect of preconditioning and adenosine pretreatment in experimental skeletal muscle reperfusion injury. British Journal of Surgery. 1999; 86: 916–922.

80) Saita Y, Yokoyama K, Nakamura K, Itoman M. Protective effect of ischaemic preconditioning against ischaemia-induced reperfusion injury of skeletal muscle: how many preconditioning cycles are appropriate? British Journal of Surgery. 2002; 55: 241-245.

81) Mounsey RA, Pang CY, Forrest C. Preconditioning: a new technique for improved muscle flap survival. Otolaryngolgy Head Neck Surgery. 1992; 107: 549-552.

82) Küntscher MV, Juran S, Sauerbier MAltman J, Menke H, Gebhard MM, Germann Günter. Role of nitric oxide in the mechanism of preclamping and remote ischemic preconditioning of adipocutaneous flaps in a rat model. Journal of Reconstructive Microsurgery. 2003; 1: 55-59.

83) Saray A, Apan A, Tellioğu AT. Adenosine treatment augments random flap survival in rats. The Canadian Journal of Plastic Surgery. 2001; 9: 193-197.

84) Sollevi A, Lagerkranser M, Irestet L, Gordon E, Lindquist C.Controlled hypotension with adenosine in cerebral aneurysm surgery.Anesthesiology. 1984; 61:400-405.

85) Yokota R, Fujiwara H, Miyamae M, Tanaka M, Yamasaki K, Itoh S, Koga K, Yabuuchi Y, Sasayama S. Transient adenosine infusion before ischemia and reperfusion protects against metabolic damage in pig hearts. American Journal of Physiology - Heart and Circulatory Physiology. 1995; 268: 1149-1157.

86) Dacho AK, Lyutenski S, Aust G, Dietz A. Highly selective A(1)-adenosine-agonist (2-chloro-N6-cyclopentyladenosine) and reduction of flap necrosis in adipocutaneous flaps in rats. Head&Neck Surgery. 2012; 34: 1100–1105.

87) Polito F, Bitto A, Galeano M, Irrera N, Marini H, Calò M, Squadrito F, Altavilla D. Polydeoxyribonucleotide restores blood flow in an experimental model of ischemic skin flaps. Journal of Vascular Surgery. 2012; 55: 479-488.

88) Chafin B, Belmont MJ, Quraishi H, Clovis N, Wax MK. Effect of clamp versus anastomotic induced ischemia on critical ischemic time and survival of rat epigastric fasciocutaneous flap. Head&Neck Surgery. 1999; 21: 198–203.