

TC
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

**İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON OLUŞTURULAN RATLARDA
TADALAFİL'İN ANASTOMOZ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ**

UZMANLIK TEZİ
Arş.Gör.Dr. Lütfi MUTLU

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yavuz KAYA

Manisa, 2009

TC
CELAL BAYAR ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
Genel Cerrahi Anabilim Dalı

İNTESTİNAL İSKEMİ REPERFÜZYON OLUŞTURULAN RATLARDA
TADALAFİL'İN ANASTOMOZ İYİLEŞMESİ ÜZERİNE ETKİSİ

UZMANLIK TEZİ
Arş.Gör.Dr. Lütflü MUTLU

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Yavuz KAYA

Manisa, 2009

İÇİNDEKİLER

İÇİNDEKİLER	ii
TABLO DİZİNİ	iii
RESİM DİZİNİ	iv
GRAFİK DİZİNİ	v
ÖNSÖZ	vi
I. GİRİŞ	1
II. GENEL BİLGİLER	3
2.1. İntestinal İskemi Reperfüzyon	3
2.2. İskemi Reperfüzyon ve Nitrik Oksit	5
2.3. Anastomoz İyileşmesi	6
2.4. Tadalafil	7
III. MATERYAL VE METOD	9
3.1. Deney hayvanlarının özellikleri	9
3.2. Cerrahi işlemler	9
3.3. Laparotomi	10
3.4. İntestinal iskemi reperfüzyon	10
3.5. İnce barsak anastomozu	11
3.6. Deneysel protokol ve deneyin yapılışı	12
3.7. Deney grupları	12
3.8. Patlama basıncı ölçümü	13
3.9. Hidroksiprolin düzeyi ölçümü	14
3.10. Dokuların fiksasyonu ve kesitlerin hazırlanması	15
3.11. Anastomoz hattının histopatolojik incelemesi	15
3.12. İstatistiksel değerlendirme	16
IV. BULGULAR	17
4.1. Anastomoz patlama basınçları	18
4.2. Hidroksiprolin değerleri	19
4.3. Histopatolojik değerlendirme	20
V. TARTIŞMA	22
VI. SONUÇ VE ÖNERİLER	27
VII. ÖZET	28
VIII. İNGİLİZCE ÖZET	30
IX. KAYNAKLAR	32

TABLO DİZİNİ

Tablo 1: Modifiye Ehrlich ve Hunt skorlaması	16
Tablo 2: Patlama basıncı ve hidrokspirolin düzeylerinin istatistiksel değerlendirilmesi	17

RESİM DİZİNİ

Resim 1: Arteria mezenterika süperior'un klempe edilmesi	11
Resim 2: İnce barsak anastomozu	11
Resim 3: Patlama basıncı ölçüm düzeneği	14
Resim 4: Histopatolojik kesitler	21

GRAFİK DİZİNİ

Grafik 1: Gruplara göre patlama basıncı dağılımları	18
Grafik 2: Anastomoz patlama basıncı ortalamaları	18
Grafik 3: Gruplara göre hidroksiprolin değerleri dağılımı	19
Grafik 4: Grupların hidroksiprolin düzeyi ortalamaları	20

ÖNSÖZ

Uzmanlık eğitimim süresince bilgi ve tecrübelerinden yararlandığım, bana her konuda destek ve yardımlarını esirgemeyen başta Anabilim Dalı başkanımız Prof.Dr. Teoman Coşkun olmak üzere Prof. Dr. Mustafa Tireli, Doç.Dr. M.Yamaç Erhan, Doç.Dr. Hasan Aydede, Doç.Dr. Yavuz Kaya, Doç.Dr. Aslan Sakarya ve Doç.Dr. Eray Kara'ya;

Asistanlığım süresince birlikte çalıştığım tüm asistan arkadaşlarıma, Genel Cerrahi Ameliyathane / Servis hemşire ve personeline;

Bu çalışmanın tamamlanmasındaki katkılarından dolayı; özellikle tez danışmanı hocam Doç.Dr. Yavuz Kaya başta olmak üzere, Patoloji Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Semin Ayhan'a, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyesi Doç. Dr. Ahmet Var'a ve her konuda benden yardımını esirgemeyen Anatomi Anabilim Dalı Başkanı Prof.Dr. Tuncay Varol'a;

Ayrıca bana sonsuz desteklerini ve sevgilerini hiçbir zaman esirgemeyen, benim için her şeyi olur kılan anneme ve babama, tüm aileme ve sevdiklerime, asistanlık hayatım boyunca her türlü kahrımı çeken ve benden desteğini hiçbir zaman esirgemeyen sevgili eşime sonsuz sevgi ve saygılarımı sunar, teşekkür ederim.

Dr. Lütfi MUTLU

I. GİRİŞ

Gastrointestinal sistem cerrahisi sonrası gelişen mortalite ve morbiditeden sorumlu faktörler içerisinde anastomoz kaçakları halen ilk sıradaki yerini korumaktadır. Anastomoz iyileşme sürecinin başarılı bir şekilde tamamlanabilmesi için birçok faktörün bir arada bulunması gerekmektedir. Anastomozun kanlanması ve oksijenizasyonu bunların en önemlileridir (1).

İnce barsak iskemi reperfüzyonu klinikte çok çeşitli durumlarda gelişebilir. Kanama, travma, mezenterik vasküler hastalık gibi durumlarda ve arterlerin geçici olarak klempe edilmesinin gerekli olduğu cerrahi girişimlerde ince barsak iskemi reperfüzyonu ortaya çıkabilir (3,4,5). İnce barsak iskemi ve reperfüzyonu anastomoz iyileşmesini bozarak anastomoz kaçağına sebep olabilir ve ciddi morbidite, mortalite ile sonuçlanabilir (2).

Bir doku iskemiye maruz kaldığında, hücre için gerekli olan uygun enerjinin sağlanabilmesi ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması için iskemik dokulara kan akımının yeniden sağlanması gereklidir. Ancak kan akımının yeniden sağlanması paradoksal olarak dokularda iskemik hasara ek olarak bir dizi metabolik olay sonucu yeni bir hasara yol açar (1,6). Birçok vazoaktif mediatör ve serbest oksijen radikali salınımı ile, reperfüze edilen dokuda lökosit aktivasyonu, endotel disfonksiyonu ve doku ödemi gerçekleşir. Tüm bu faktörler anastomoz kanlanmasını bozabilir. Ayrıca salınan mediatörler anastomoz etrafında olumsuz etkilere yol açabilir (1,7).

Tadalafil, nitrik oksit/siklik guanozin monofosfat yolağında siklik guanozin monofosfatı inaktive eden fosfodiesteraz enziminin vasküler düz

kas hücrelerinde ve trombositlerdeki spesifik inhibitördür. Bu etkisi sonucunda arter ve venlerde vazodilatasyon yaparak kan akımını arttırır ve trombosit agregasyonunu inhibe ederek mikrosirkülasyonu düzenler (8,9).

Biz bu çalışmada intestinal iskemi reperfüzyon oluşturulan ratlarda Tadalafil'in ince barsak anastomoz iyileşmesine etkisini araştırmayı amaçladık.

II. GENEL BİLGİLER

2.1. İntestinal İskemi ve Reperfüzyon

Günlük uygulama içerisinde tıbbın pek çok dalında iskemi ve reperfüzyonun yer aldığı olgular vardır. Kanama, hipovolemi, kalp yetmezliği, travma, inkarsere inguinal herni, volvulus, invajinasyon, mezenterik vasküler hastalık, hipoksi, hipotansiyon, şok, koagülopatiler, vaskülopatiler, karaciğer cerrahisi, inflamatuvar barsak hastalıkları, serbest pediküllü barsak flebi kullanımı, barsak transplantasyonu, kardiyak ve aortik cerrahi ile arterlerin geçici olarak klempe edilmesinin gerekli olduğu diğer cerrahi girişimlerde de ince barsak iskemi reperfüzyonu ortaya çıkabilir (3,4,5). Ayrıca kalp ve damar hastalığı olan yaşlılarda arteriel emboli veya in situ trombüse bağlı olarak da ince barsak iskemi reperfüzyonu gelişebilir (7).

İnce barsaklarda 20 dakikadan kısa süren iskemi mukozada anlamlı bir değişiklik yapmazken 2 saatten uzun süren iskemi transmural nekroza kadar giden kalıcı hasara neden olabilmektedir (11). Reperfüzyon ise dokular üzerinde, öncesindeki iskemik hasara ek olarak yeni hasar oluşturur (6).

Bir dokuya giden kan akımı kesildiğinde, o dokuya ait hücrelerin fonksiyon bozukluğu ile başlayan ve hücre ölümüne kadar ilerleyen bir dizi biyokimyasal olay gerçekleşir. Hücresel fonksiyonların gerçekleşebilmesi için gerekli temel yakıt oksijendir. Normal hücre fonksiyonları için gerekli olan yüksek enerjili fosfat bağları aerobik metabolizma ile sağlanır. Oksijen yetersizliği durumunda anaerobik metabolizma devreye girer. Bu da laktik

asit ve toksik metabolitlerin birikimi ile sonuçlanır. Ortaya çıkan asidoz nedeniyle normal enzim kinetiği değişir ve yüksek enerjili fosfat bağlarının yapımı azalır. Bu durumda hücre kendi homeostazı için gerekli olan enerjiden yoksun kalır (6,12).

Reperfüzyon, iskekiye neden olan etkenin ortadan kaldırılarak dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır. Reperfüzyonun, iskemik dokuda enerji ihtiyacının sağlanması ve toksik metabolitlerin uzaklaştırılması gibi iki olumlu etkisi vardır. Böylelikle reperfüzyon iskemik hasarın düzeltilebilmesi için gerekli bir süreçtir. Ancak oksijenlenmiş kanın iskemik dokuya dönüşü dokuyu daha fazla zedeleyen bir reaksiyon sürecini başlatır (1,6).

Reperfüzyon hasarı serbest oksijen radikalleri, endotelial faktörler ve nötrofillerin eşlik ettiği karmaşık bir mekanizmayla gerçekleşir. Hasarı asıl tetikleyen olayın endotel hücrelerindeki zedelenme olduğu düşünülmektedir (12,13).

Reperfüzyon hasarına doğrudan veya dolaylı olarak katılan pek çok madde ve biyokimyasal reaksiyon tanımlanmıştır. Bu maddelerin birbiriyle etkileşimi sonucunda iskekiye reperfüzyon hasarının reperfüzyon kısmının mediatörleri olan serbest oksijen radikalleri ortaya çıkar. Yeniden kan akımı ile birlikte oksijenin redüksiyonu ve aerobik hücrelerin enzimatik oksidasyonu sırasında negatif yüklü bir ara ürün olan süperoksit radikali oluşur. Süperoksit radikalinden enzimatik yolla veya spontan dismutasyonla ikinci bir ara ürün olan hidrojen peroksit radikali oluşur. Daha sonra özellikle mitokondride diğer bir ürün olan hidroksil radikali oluşur (6,14).

Organizmada serbest oksijen radikalleri ortaya çıktıktan sonra radikal reaksiyon dizileri başlar. Serbest oksijen radikalleri paylaşılmamış elektronlarından dolayı lipid, protein, karbonhidrat, nükleik asit gibi çeşitli makromoleküllerin oksidatif hasarına ve hücre zedelenmesine neden olurlar (14). Bu hasarlar; lipid peroksidasyonu, protein oksidasyonu, DNA hasarı, kovalen bağlanma ve kalsiyum transportunun engellenmesi aracılığı ile gerçekleşir (6,14,15).

İskekiye reperfüzyonda endotel hücreleri tarafından bazı koruyucu ajanlar oluşturulur. Bunlardan biride nitrik oksit(NO)'dir (16).

NO, endotel hücrelerinde kalsiyum ve calmoduline bağımlı bir enzim olan nitrik oksit sentetaz ile oluşturulur (16). NO'nin etkileri guanilat siklazin aktivasyonu ve böylece siklik guanozin monofosfat(cGMP) oluşumu ile düzenlenir (17). NO reperfüzyon sırasında endotel hücreleri tarafından oluşturulan süperoksit radikallerini nötralize eder, vazodilatasyon yapar, trombosit adherensini inhibe eder (16,17,18).

2.2. İskemi Reperfüzyon ve Nitrik Oksit

Bütün memeli hücreleri tarafından sentezlenebilen NO, kan damarları geriliminin düzenlenmesinden, sinirler arası iletişime ve savunma sistemine kadar pek çok fizyolojik olayda anahtar görevi gören bir moleküldür (19).

NO sentezi, nitrik oksit sentetaz enzimi ile L-arginin'den olmaktadır. NO'nin fazla miktarda oluşumu dokular için toksik olduğundan hızla etkisiz hale dönüştürülür.

NO için klasik bir reseptör bölgesi yoktur; guanilil siklazin "hem" grubuna bağlanarak, hücre içi ikincil haberci molekül olarak çalışan cGMP'nin birikmesine neden olur. cGMP, miyozin hafif zincir kinazın defosforilasyonuna neden olarak düz kas gevşemesi yapar. Yarı ömrü kısadır (3-5 saniye) ve lokal olarak etkilidir. NO'nin antitrombositler, antimitojenik, sitotoksik etkileri olduğu anlaşılmıştır. NO'nin ayrıca süperoksit akümüülasyonunu düzenlediği ve hücre membran geçirgenliğinin artışını engellediği fark edilmiştir (20). Ancak NO'nin süperoksit ile etkileşime girerek peroksinitrit oluşumu ile sonuçlanan sitotoksik etkileri de bulunmaktadır. İskemi reperfüzyonda bazı dokularda NO'nin plazma ve doku düzeyleri azalır. NO seviyesindeki bu azalma endotelial hasar ve disfonksiyondan kaynaklanabilir (19).

NO yara iyileşmesinde vasodilatasyon ve anjiogenez için gereklidir. Yara iyileşmesinin inflamasyon fazının major moleküllerinden biri NO'dir ve yara iyileşmesinin her fazında önemli etkileri vardır, ilk 72 saatte NO'nin birçok primer etkisi yara iyileşmesini destekleyicidir (21,22). İskemi reperfüzyon NO'nin bu yararlı etkilerine engel olmaktadır.

NO'in immun defans, oksijen radikallerinin azaltılması, lökosit adezyonunun inhibisyonu, damar geçirgenliğinin azaltılması, antitrombositer etki ve vazodilatasyon gibi iskemi reperfüzyondan koruyucu etkilerinin yanı sıra; peroksinitrit üretimi, endotel disfonksiyonu, lökosit-endotel hücre etkileşimi gibi zararlı etkileride vardır (19,20). NO'in iskemi reperfüzyon hasarı üzerine net etkisi anlaşılamamış olup halen araştırma konusu olmaya devam etmektedir.

2.3. Anastomoz İyileşmesi

Gastrointestinal sistemde anastomoz yara iyileşmesi komplikasyon olmadığı durumlarda hızlı olmaktadır. Anastomozların inspeksiyona izin vermeyecek anatomik yerleşimde olmaları nedeni ile cerrah, ameliyatın başarısını hastanın genel iyilik halinden takip eder. Komplikasyonlarda genellikle reoperasyon gerekir. Bu da ek laparotomi ve genel anestezinin morbiditesini beraberinde getirir. Bu durum cerraha anastomozun iyileşme sürecini bozabilecek her türlü preoperatif, intraoperatif ve postoperatif faktörlere duyarlı olma sorumluluğu yükler.

Gastrointestinal sistemde, yara gerilim kuvvetinin çoğu submukoza tarafından sağlanır. Gastrointestinal sistemde anastomoz yara iyileşmesi ile diğer dokulardaki yara iyileşmesi arasında farklar vardır;

- 1- Gastrointestinal sistemde yaranın kuvvet kazanması, cilttekinden daha hızlıdır.
- 2- Yara iyileşmesinde kollajen sentezi, gastrointestinal sistemde fibroblast ve düz kas hücrelerinde olurken, ciltte sadece fibroblastlarda olmaktadır.
- 3- Ciltte kollajen sentezi fibroblastlarla düzenlenirken, gastrointestinal sistemde farklı şekilde çeşitli faktörlerin etkisi ile düzenlenir (23).

Gastrointestinal sistemde anastomoz yara iyileşmesini etkileyen faktörler iki başlık altında toplanabilir (1,23,24):

A-Lokal faktörler; Yeterli kan akımı, anastomotik gerilim, yara kenarlarının durumu, bakteriyel kontaminasyon, distal obstrüksiyon, radyasyon hasarı, barsağın hazırlanması vb. faktörlerdir.

B-Sistemik faktörler; Hastanın beslenmesi, sepsis, hipovolemi, ilaç tedavisi, immün yetmezlik, kan transfüzyonu, üremi, sarılık vb. faktörlerdir.

Anastomozun kanlanması büyük öneme sahiptir ve bu esas olarak intrinsik damarlanmaya bağlıdır (25). Barsağın cerrahi mobilizasyonu anastomozun perfüzyonunu belirlemede temel noktadır. Çünkü aşırı veya kaba mobilizasyon barsağı besleyen önemli damarlara zarar verebilir. Mobilizasyon uygun yapılmazsa anastomoz üzerindeki gerilim anastomoz perfüzyonunu bozabilir ve inflamatuvar hücre infiltrasyonunu arttırabilir (26). Uygun kan akımı ve oksijenizasyon kollajen sentezinde lizin ve prolin hidroksilasyonu için şarttır (27,28). Doku oksijen desteği ile anastomoz patlama gücü ve hidroksiprolin içeriği arasında da yakın korelasyon vardır (29,30).

Kuzu ve arkadaşları çalışmalarında iskemi ve reperfüzyon hasarına uğramış barsaklarda anastomoz iyileşmesinin bozulduğunu göstermişlerdir (1).

2.4. Tadalafil

Tadalafil Fosfodiesteraz-5(PDE-5) enziminin spesifik inhibitörüdür. Spesifik PDE-5 inhibitörleri cGMP'ı metabolize eden fosfodiesterazları inaktive eder. Buna bağlı olarak, cGMP'ın birikimi düz kas relaksasyonun artmasına ve hedef dokuda kan akımı artışına neden olur. PDE-5 vasküler sistemde yaygın olarak bulunur. Mezenterik arter, pulmoner arter, safen ven örneklerinde de saptanmıştır (31).

Tadalafil diğer PDE'lara göre PDE-5'i 10000 kat daha selektif inhibe eder. Orjinal antianginal olarak kullanıma girmesine karşın erektil disfonksiyon ve pulmoner hipertansiyon tedavisinde kullanımı ile popüler olmuştur (31).

Tadalafil NO/cGMP yolağında cGMP'ı inaktive eden fosfodiesteraz enziminin vasküler düz kas hücrelerinde ve trombositlerdeki spesifik inhibitörüdür. NO cGMP'ı uyarır bu hücrel cevap yoluyla vasodilatasyona yol açar. cGMP fosfodiesterazlarla inaktif formu olan guanozin mono fosfat(GMP)'a çevrilir. PDE-5'in inhibisyonu NO'in etkilerini uzatır. Bu etkisi sonucunda Tadalafil periferik arter ve venlerde vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunda inhibisyon yaparak mikrosirkülasyonu düzenler (8,9).

Bu gün kullanımda olan 4 PDE-5 inhibitörü vardır; Sildenafil, Vardenafil, Tadalafıl, Udanafil. Bunların yarı ömürleri sırayla 4, 4.5, 17.5 ve 12 saattir. Tadalafil yarı ömrü en uzun PDE-5 inhibitörüdür, oral biyoyararlanımı çok iyidir, Tmax değeri 2 saattir ve emilimi gıda alımından etkilenmez. Tadalafil PDE-5'i inhıbe eden en selektif inhibitördür bu nedenle diğer PDE-5 inhibitörlerine göre yan etkileri daha az ve seyrek görülür. Yan etkileri arasında baş ve kas ağrısı, dispeptik yakınmalar, flushing, nonarteritic anterior iskemik noropati sayılabilir. Tadalafil ile birlikte en az 24 saat nitritler ve diğer antihipertansifler kullanılmamalıdır (31).

III. MATERYAL VE METOD

Bu çalışma, Celal Bayar Üniversitesi Tıp Fakültesi Bilimsel Araştırmalar Hayvan Etik Kurulu'nun 20/06/2008 tarih, 026 sıra numaralı uygunluk kararı ile Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deneysel Araştırma Laboratuvarında yapıldı.

3.1. Deney hayvanlarının özellikleri

Bu çalışmada Ege Üniversitesi Tıp Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'ndan temin edilen erkek cinsi, ortalama ağırlıkları 200-250 gram olan Sprague-Dawley tipi ratlar kullanıldı. Ratlar çalışmadan 10 gün önce laboratuvara getirilerek çalışma ortamına uyum göstermeleri sağlandı. Ratlar oda sıcaklığında, 12 saat aydınlık ve 12 saat karanlık periyodunda tel kafesler içinde tutuldular. Spontan olarak alabildikleri kadar standart rat yemi ve çeşme suyu ile beslendiler.

3.2. Cerrahi İşlemler

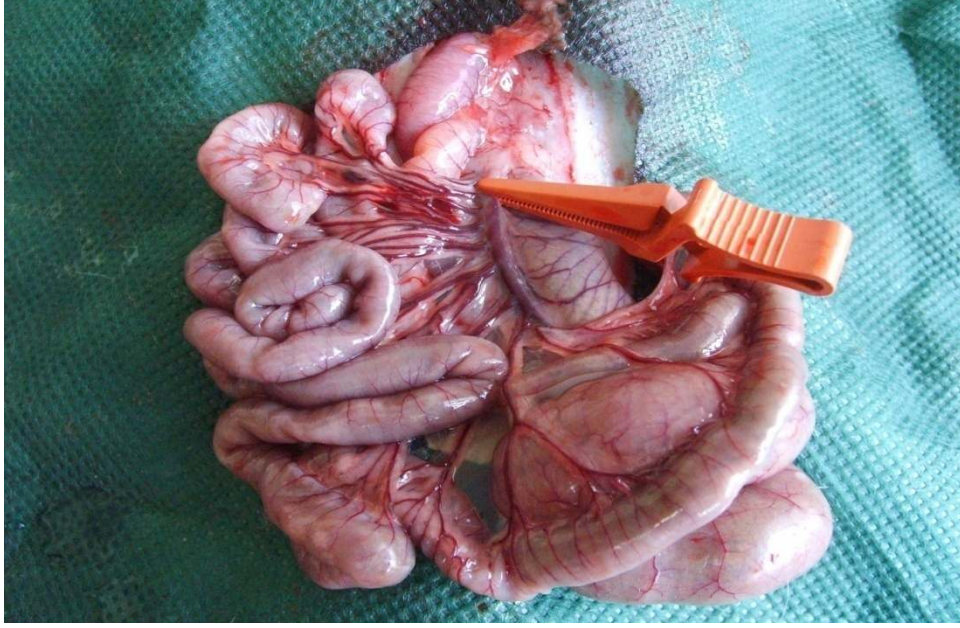
Cerrahi işlemler için ketamin hidroklorür 50mg/kg (Ketalar® 50mg/ml, Eczacıbaşı, İstanbul, Türkiye) ve ksilazin hidroklorür 5mg/kg (Rompun®, 23.32 mg/ml, Bayer, İstanbul, Türkiye) anestezisi kullanıldı. Ratların diürenal değişimlerden etkilenmemeleri için bütün cerrahi işlemler gün içinde aynı saatlerde yapıldı.

3.3. Laparotomi

Ratlar, dört ekstremiteleri aracılığı ile stabilize edilerek supin pozisyonunda çalışma masasına alındı. Karın derisindeki tüyler elektrikli tıraş makinesi ile temizlendi. Bölge temizliği % 10 povidon-iyodin solüsyonu ile yapıldı. Ardından dört santimetre orta hat kesisi ile batına girildi. Cerrahi işlemler sırasındaki sıvı kaybının oluşturacağı hipovolemik etkiler göz önünde bulundurularak laparotomi kesisi kapatılmadan önce periton boşluğuna 40 ml/kg %0.9 NaCl solüsyonu verildi. Kesi periton ile fascia beraber ve cilt ayrı olarak iki kat halinde devamlı 3/0 ipek sütürlerle kapatıldı.

3.4. İntestinal İskemi ve Reperfüzyon

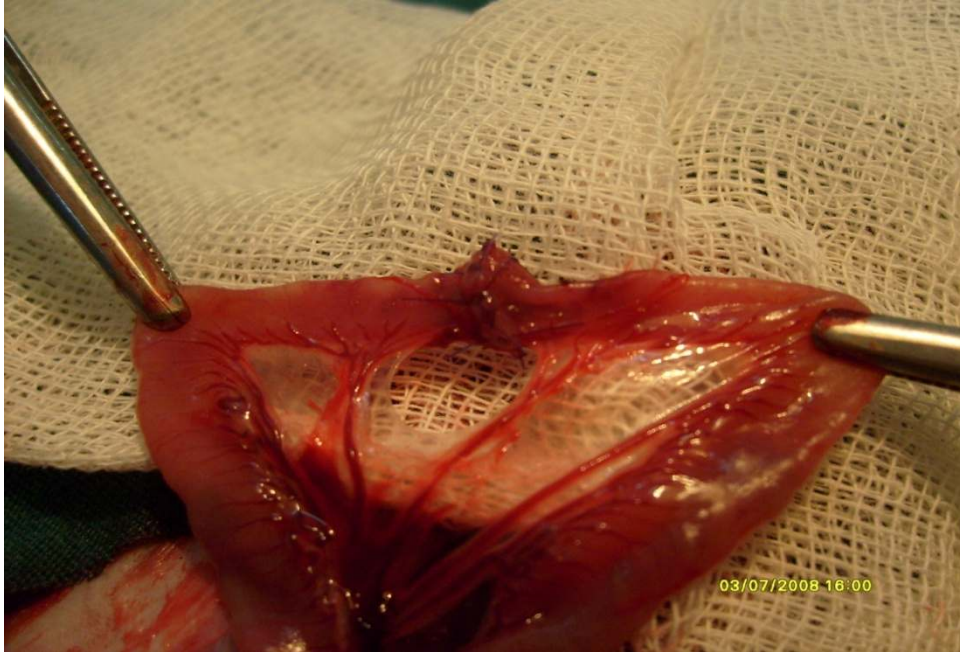
Megison ve arkadaşlarının tanımladığı tekniğe uygun olarak intestinal iskemi ve reperfüzyon yapıldı (10). Arteria mezenterika süperior, aortadan çıktığı yere kadar diseke edilerek arteria kolika medianın ayrıldığı yerin hemen distalinden mikrovasküler atravmatik klemp (Vascu-statt, Scanlan, ABD) ile klemlendi (**Resim 1**). Mutlak ince barsak iskemisi oluşturmak için arteria mezenterika süperior ile eş zamanlı olarak, ileoçekal bileşkenin beş santimetre distalinde arteria kolika dekstradan ve doudenojejunal bileşkede proksimal jejunal arterlerden gelen kollateral arterler, aynı tip klemler ile klempe edildi. 30 dakika iskemi sonunda bütün klemler açıldı.



Resim 1: Arteria mezenterika süperior'un klempe edilmesi

3.5. İnce Barsak Anastomozu

Çekumun yaklaşık 15 santimetre proksimalinden tam kat kesi yapıldı. Uçlar 6/0 PDS(B.Braun MelsungenAG 8714827, Germany) ile tek kat olarak, tek tek sütürler ile uç uca anastomoz edildi (**Resim 2**) .



Resim 2: İnce barsak anastomozu

3.6. Deneysel Protokol ve Deneyin Yapılışı

Bu çalışmanın amacı; intestinal iskemi ve reperfüzyon oluşturulan ratlarda Tadalafil'in ince barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisini araştırmaktır. Bunun için ratlarda 30 dakikalık intestinal iskemi ve ince barsak anastomozunu içeren bir deneysel model oluşturuldu. Anastomoz iyileşmesi, anastomoz patlama basıncı, perianastomotik doku hidroksiprolin düzeyi ve histopatolojik olarak modifiye Ehrlich-Hunt skorlaması ile değerlendirildi.

3.7. Deney Grupları

Ratlar rastgele seçilerek dört gruba ayrıldı:

Grup 1 (n= 12) : Normal ince barsağa anastomoz yapıldı.

Grup 2 (n=12) : Normal ince barsağa anastomoz yapıldı. Tadalafil verildi.

Grup 3 (n= 12) : 30 dakika intestinal iskemi reperfüzyon ve ince barsak anastomozu yapıldı.

Grup 4 (n=12) : 30 dakika intestinal iskemi reperfüzyon ve ince barsak anastomozu yapıldı. Tadalafil verildi.

Birinci ve üçüncü gruba operasyondan 2 saat önce başlanarak dört gün boyunca orogastrik tüp aracılığı ile 1ml serum fizyolojik verildi.

İkinci ve dördüncü gruba ise operasyondan 2 saat önce başlanarak dört gün boyunca 10mg/kg/gün Tadalafil(Cialis; Eli Lilly and Company Ltd., Basingstoke-England) 1 ml serum fizyolojik içinde süspansiyon haline getirilerek orogastrik tüp aracılığı ile verildi.

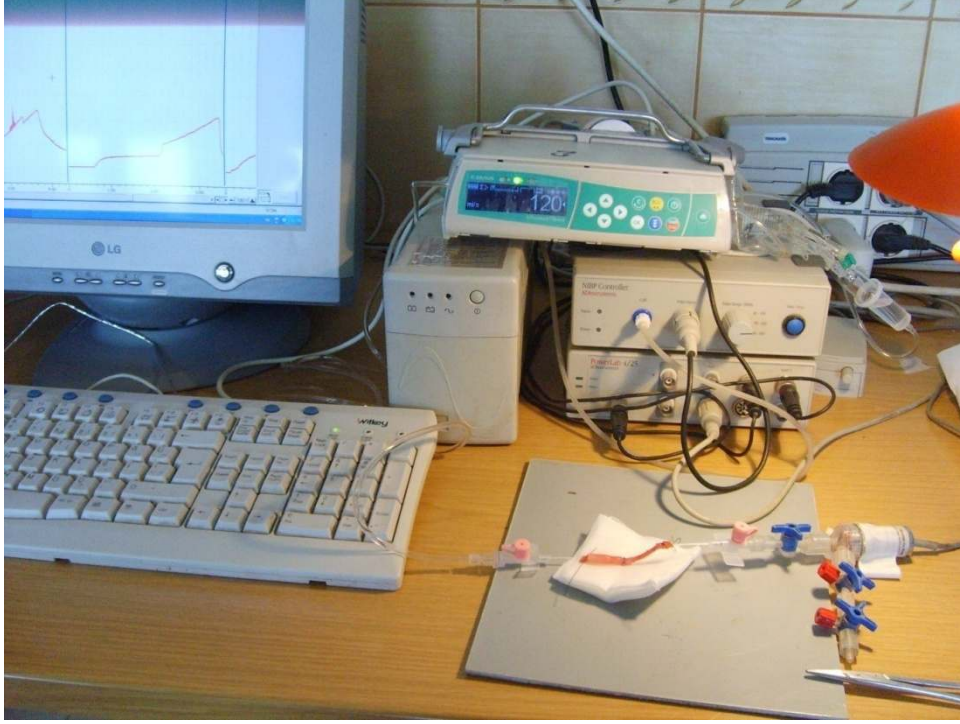
Postoperatif dördüncü gün ratlar sakrifiye edildi. Relaparotomi yapıldı. Hiçbir ratta nekroz, anastomoz kaçağı, abse, peritonit ve kanama gibi komplikasyonlar saptanmadı. Daha sonra anastomoz hattını içine alan geniş bir barsak segmenti rezeke edildi. Anostomoz patlama basıncı ölçüldükten sonra rezeke edilen barsak segmenti longitudinal olarak iki eşit parçaya ayrıldı. Parçaların bir yarısı histopatolojik incelemeler için % 10'luk nötral

formalin solüsyonu içinde saklandı. Diğer yarısı biyokimyasal incelemeler için oda sıcaklığındaki serum fizyolojik ile yıkandıktan sonra alüminyum folyolara sarılarak -80 °C derin dondurucuda saklandı.

3.8. Patlama basıncı ölçümü

Anastomoz iyileşmesi mekanik olarak anastomoz patlama basıncı ölçümü ile değerlendirildi (32,33,34). Anastomoz hattını içerecek şekilde rezeke edilen barsak segmenti masaya alındı. Anastomoz hattının iki santimetre distal ve iki santimetre proksimali bir cetvel yardımı ile işaretlenerek proksimal uç basınç ölçümü, distal uç sıvı vermek amacıyla kullanıldı. Bu amaçla proksimal uca bir plastik kateter konuldu ve işaretlenen yerde kateterin üzerinden 3/0 ipek ile bağlanarak uç kapatıldı. Buraya konulan plastik kateter ile transducer ve basınç monitörü (Power LabML8454/25 Data Recording SystemMLT0380/A Reusable Blood Pressure Transducer AD Instruments Pty Ltd, Castle Hill, NSW 2154, Australia) arasında bağlantı kuruldu.

Barsak segmentinde basınç oluşturmak için sıvı verilebilmesi amacıyla distal uçtan bir plastik kateter konuldu ve işaretlenen yerde kateterin üzerinden 3/0 ipek bağlanarak bu uç da kapatıldı. Distal uçtan yerleştirilen kateter ile perfüzör (B.Braun Typ 8713050 Melsungen AG, Germany) arasında bağlantı kuruldu. Perfüzör dakikada 2 ml sıvı verecek şekilde ayarlandı. Bu şekilde barsaklara volüm yüklenerek basınç oluşması sağlandı. Lümen içinde artan basınç grafiksel olarak monitörden izlendi. Basıncın aniden düştüğü pik seviyesi anastomoz patlama basıncı olarak kabul edildi (**Resim 3**).



Resim 3: Patlama basıncı ölçüm düzeneği

3.9. Hidroksiprolin düzeylerinin ölçülmesi

Örnek dokular tartıldıktan sonra 6 N HCl içinde 110 °C'de otoklavda hidroliz edilerek hidroksiprolinlerin dokudan serbestleşmesi sağlandı. Homojenatlar NaOH ile titre edilerek pH 7,5-8 arasına ayarlandı. Homojenattaki hidroksiprolin izopropanol ile ekstrakte edildikten sonra ortama oksitleyici ayıraç olan chloramin-T ilave edilerek hidroksiprolin pirol benzeri bir bileşik oluşturuldu. Bunun üzerine p-dimetil amino benzaldehit (Ehrlich reaktifi) ilave edildi ve meydana gelen renkli kompleks 550 nm'de spektrofotometrede(Shimadzu UV-1401, Japan) okundu. 100 mg/dl stok L-Hidroksiprolin 2 N NaOH içinde çözülerek bir seri dilüsyonla çalışma standartları oluşturuldu. Çizilen standart eğri-absorbans grafiğine göre örneklerdeki hidroksiprolin düzeyleri hesaplandı (35).

3.10. Dokuların fiksasyonu ve kesitlerin hazırlanması

İleuma ait doku ve kesitler anastomoz hattını içerecek şekilde hazırlandı. Dokular, 48 saat % 10 'luk nötral formalin ile fikse edildikten sonra takip kasetlerine alındı. Takip kasetleri içinde, sırası ile % 70, % 80, % 90, % 96 ve tekrar % 96'lık alkolde 60'şar dakika ve absolü alkolde 30 dakika bekletildi. Dehidrasyon işleminden sonra 10'ar dakika ksilol-1 ve ksilol-2'de, 30 dakika parafin-1'de ve 120 dakika parafin-2'de bekletildi. Parafin bloklar içine gömülen dokulardan rotary mikrotom(RM 2135,Leica) ile 4-5 mikron kalınlığında seri kesitler alındı. Kesitler, hematoksilin-eozin boyaması için frost lamlara yerleştirildi. Deparafinizasyon ve hidrasyon işlemleri için, önce 60 °C sıcaklıktaki etüvde 60 dakika tutuldu. Sonra, 10'ar dakika ksilol-1, ksilol-2, absolü alkol-1 ve absolü alkol-2'de, ikişer dakika % 96'lık alkol-1 ve 2'de ve beş dakika distile suda bekletilerek, hematoksilin-eozin boyamasına hazır hale getirildi.

3.11. Anastomoz hattının histopatolojik incelemesi

Anastomoz hattı kesitleri, hidrasyon işleminden geçirildikten sonra, üç dakika hematoksilin (01562E, Surgipath, Bretton, Peter Borough, Cambridgeshire) boyasında bekletildi. Sonra % 1'lik asit alkole bir kez daldırılıp çıkarıldı. Sonra sırası ile çeşme suyundan, eozin boyasından, çeşme suyundan, % 70, % 80, % 90 ve % 96'lık alkollerden, absolü alkol-1 ve 2'den, ksilol-1,2 ve 3' ten, birer dakika bekletilerek, geçirildi. Kesitler ışık mikroskopunda (Olympus CH 30) x400 büyütme ile incelendi. Anastomoz yara iyileşmesi, histopatolojik olarak modifiye Ehrlich-Hunt skorlaması ile değerlendirildi (**Tablo 1**) (36,45).

Tablo 1: Modifiye Ehrlich ve Hunt skorlaması

Grade	İnflamatuvar hücre infiltrasyonu	Damar reaksiyonu	Kollajen birikimi
0	Yok	Yok	Yok
1	Nadir	Nadir	Nadir
2	Seyrek dağılımlı	Seyrek dağılımlı	Seyrek dağılımlı
3	Bol	Bol	Bol
4	Sık dağılımlı	Sık dağılımlı	Sık dağılımlı

3.12. İstatistiksel değerlendirme

İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 16.0 for Windows” (SPSS Inc, Chicago, IL, ABD) paket programı kullanılarak yapıldı. Parametrik verilerin kendi içerisindeki dağılımlarının istatistiksel analizi tek yönlü varyans analiz testi olan Anova ile, gruplar arasındaki farklılıkların değerlendirilmesi Post Hoc çoklu karşılaştırma testi olan Tukey ile yapıldı. P değerinin 0.05’den küçük olması istatistiksel olarak anlamlı kabul edildi.

IV. BULGULAR

Anastomoz patlama basınçları ve hidrokspirolin düzeylerinin gruplara göre dağılımı ve istatistiksel değerlendirmesi toplu olarak Tablo 2’de verilmiştir.

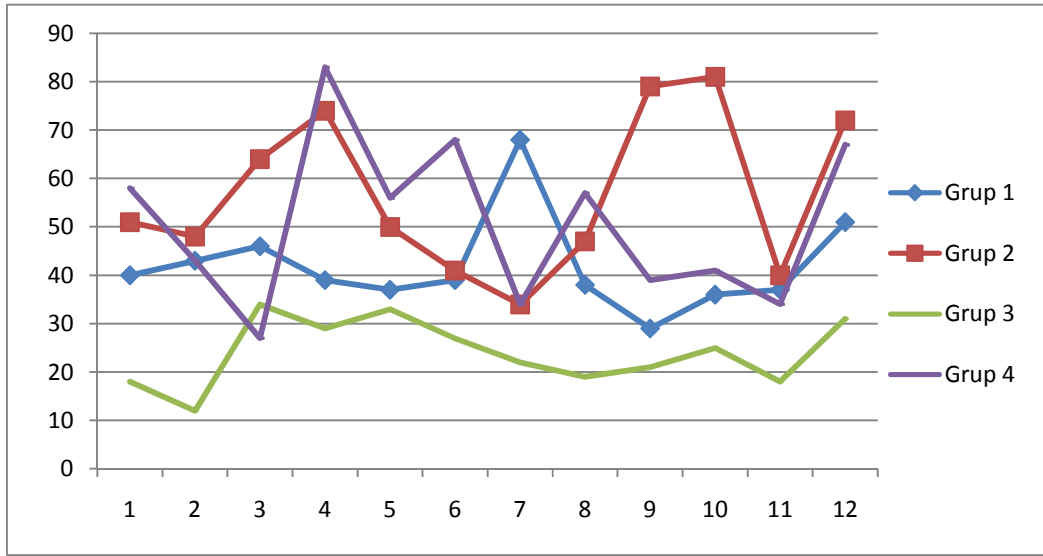
Tablo 2: Patlama basıncı ve hidrokspirolin düzeylerinin istatistiksel değerlendirmesi

	Gruplar arası p değeri									
	Grupların ortalamaları ve standart hatalar				Grup 1 ile			Grup 2 ile		Grup 3 ile
	Grup 1	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 2	Grup 3	Grup 4	Grup 3	Grup 4	Grup 4
PB	41,92±2,84	56,75±4,74	24,08±1,98	50,58±4,88	,041*	,010*	,386	,000*	,665	,000*
HP	12,08±1,60	15,66±0,83	8,04±0,21	14,40±0,98	,081	,038*	,394	,000*	,823	,000*

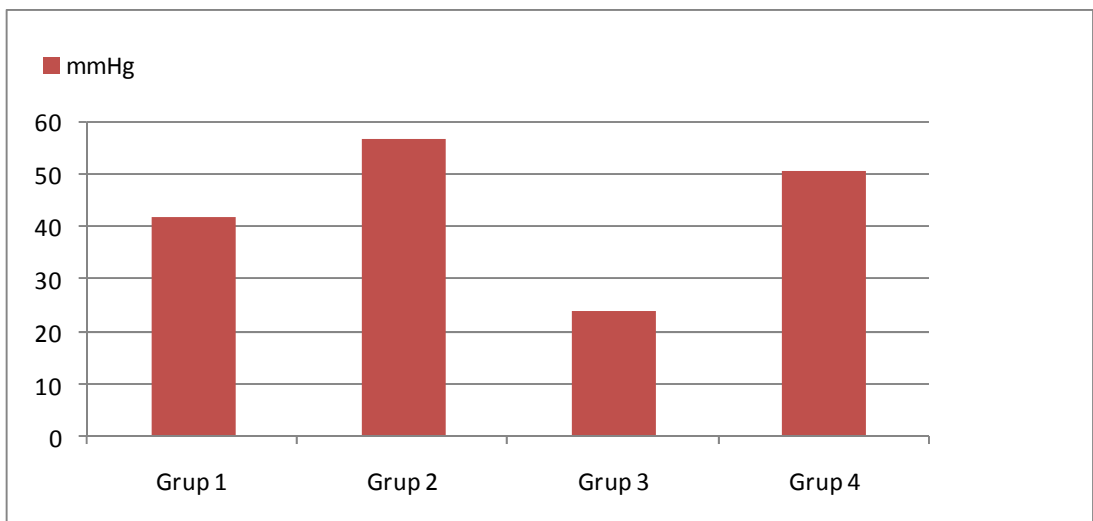
PB: Patlama Basıncı, HP: Hidrokspirolin
*** ile işaretli olanlar istatistiksel olarak anlamlıdır.**

4.1. Anastomoz patlama basınçları

Tüm gruptaki ratların anastomoz patlama basınçları dağılımı **Grafik 1**'de ve ortalamaları **Grafik 2**'de gösterilmiştir. Tüm grupların verilerinin kendi aralarındaki dağılımında Anova testi ile anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p:0,000$).



Grafik 1: Gruplara göre patlama basıncı dağılımları



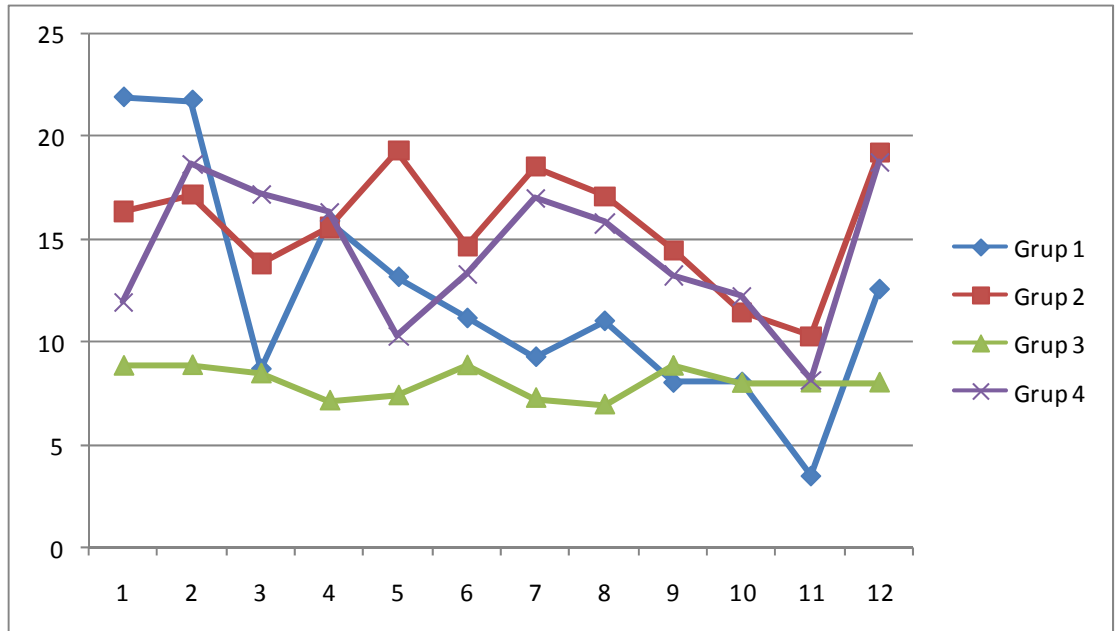
Grafik 2: Anastomoz patlama basıncı ortalamaları

En yüksek ortalama anastomoz patlama basıncı normal barsağa anastomoz + Tadalafil uygulanan grup II'de elde edildi. Normal barsağa anastomoz yapılan ve Tadalafil verilen grup II'de grup I'e göre, iskemi reperfüzyon anastomoz yapılan ve Tadalafil verilen grup IV'de grup III'e göre daha yüksek patlama basınçları elde edildi ($p:0,041$ ve $p:0,000$).

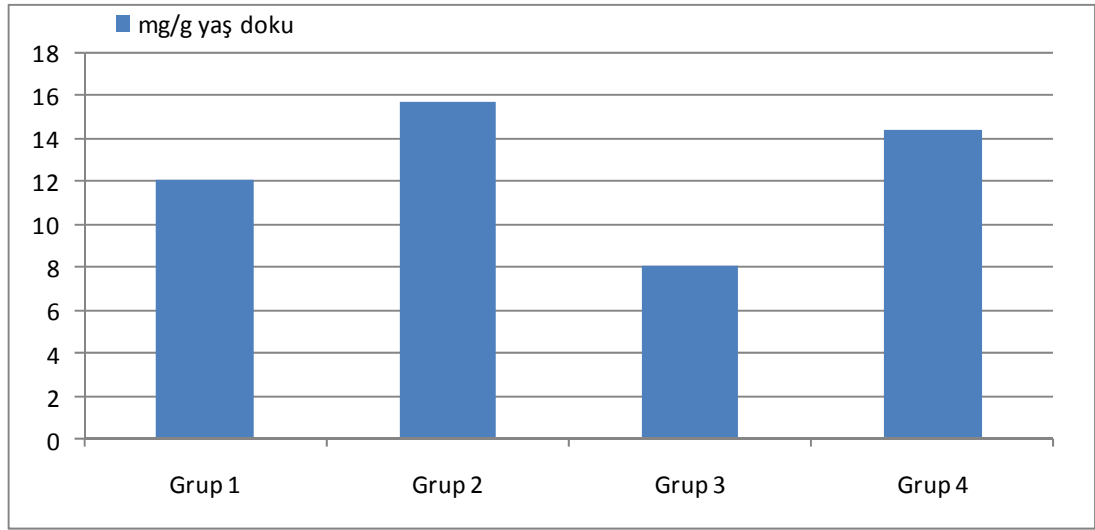
Tadalafil hem normal barsağa yapılan anastomozda hemde iskemi reperfüzyon oluşturulan barsağa yapılan anastomozda, anastomoz patlama basınçlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde arttırdı.

4.2. Hidroksiprolin değerleri

Tüm gruplardaki hidroksiprolin düzeyleri dağılımı **Grafik 3**'de ve grup ortalamaları ise **Grafik 4**'de gösterilmiştir. Tüm grupların verilerinin kendi aralarındaki dağılımında Anova testi ile anlamlı fark olduğu tespit edildi ($p:0,000$).



Grafik 3: Gruplara göre hidroksiprolin değerleri dağılımı



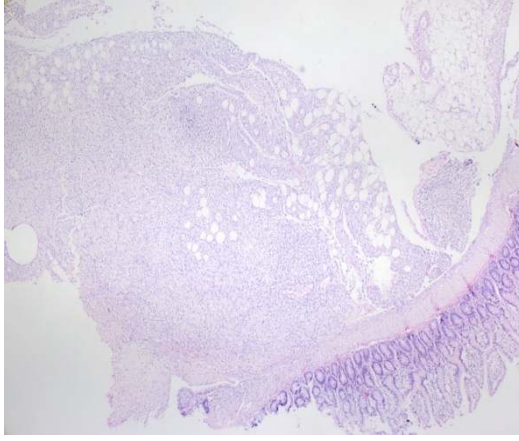
Grafik 4: Grupların hidroksiprolin düzeyi ortalamaları

En yüksek hidroksiprolin düzeyleri normal barsağa anastomoz + Tadalafil verilen grup II'de gerçekleşmiştir. Normal barsağa anastomoz yapılan ve Tadalafil verilen grup II'de grup I'e göre perianastomotik hidroksiprolin değerleri daha yüksek bulundu ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı (0,081). İskemi reperfüzyon anastomoz yapılan ve Tadalafil verilen grup IV'de grup III'e göre perianastomotik doku hidroksiprolin değerleri istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu (0,000).

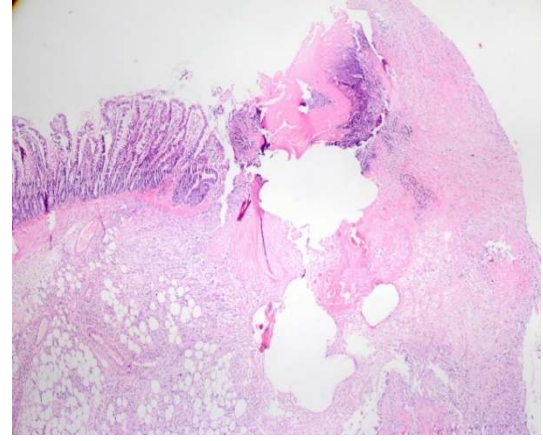
Tadalafil normal barsağa anastomoz yapılan grupta perianastomotik doku hidroksiprolin değerlerini arttırmasına rağmen istatistiksel anlamlılık bulunmadı. Ancak iskemi reperfüzyon yapılan grupta Tadalafil perianastomotik doku hidroksiprolin değerlerini istatistiksel anlamlılık oluşturacak düzeyde arttırdı.

4.3. Histopatolojik değerlendirme

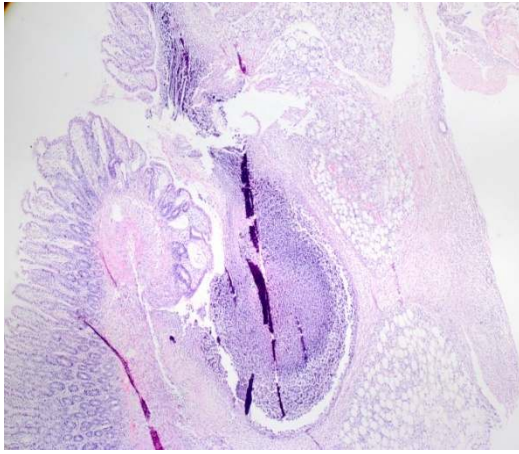
Dört ayrı deney grubundaki toplam 48 rata ait anastomoz örnekleri öncelikle kör olarak modifiye Ehrlich-Hunt skalasına göre değerlendirildi. Daha sonra her örnek kendi grubu içine yerleştirildi. Gruplar arasında histolojik değerlendirmede inflamatuvar hücre infiltrasyonu, damar reaksiyonu, kollajen birikimi açısından istatistiksel olarak anlamlı fark bulunmadı (**Resim 4**).



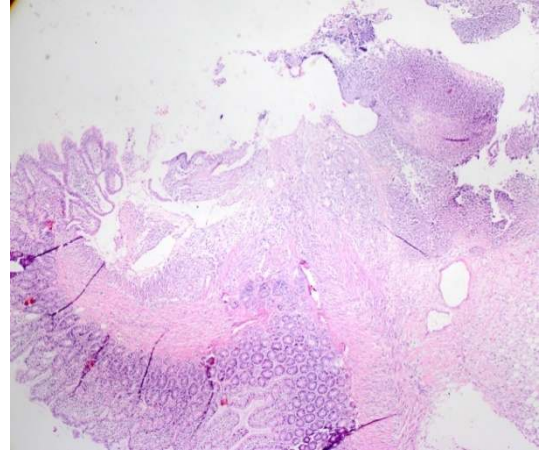
A



B



C



D

Resim 4: Histopatolojik kesitler

A:Normal anastomoz. **B:** Normal anastomoz + Tadalafil **C:** İntestinal İskemi-Reperfüzyon + anastomoz **D:** İntestinal İskemi-Reperfüzyon + anastomoz + Tadalafil

V. TARTIŞMA

İntestinal iskemi reperfüzyonun dokularda hasarlanma yaptığı ve cerrahide sık rastlanılan kompleks bir olay olduğu bilinmektedir. Mezenter damarlarda kan akımı yetersizliğine bağlı olarak oluşan hipoksi sadece barsaklarda değil, diğer hayati organlarda da hasar oluşumu ile karakterize bir durumdur. Hasarlanan dokuların hafif tahribi şeklinde olabileceği gibi bazen mortaliteye sebep olan multipl organ yetmezliğine de neden olabilmektedir.

İskemi reperfüzyon yara iyileşmesini bozan olumsuz faktörlerden biridir. Kuzu ve arkadaşları iskemi reperfüzyon hasarına uğramış barsaklarda anastomoz iyileşmesinin bozulduğunu göstermişlerdir (1). İskemi ve reperfüzyon hasarı anastomoz kaçaklarının önemli nedenlerinden biridir. Anastomoz kaçakları önemli bir morbidite ve mortalite sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır (1,2,3). Bu nedenle iskemi reperfüzyon hasarı gelişen dokularda anastomoz iyileşmesini olumlu yönde etkileyecek, kan akımı restorasyonunu sağlayacak ve iskemi reperfüzyon hasarını azaltabilecek ajanların kullanımı cerrahi araştırmalar için ilgi çekici bir konu olmaya devam etmektedir.

Tadalafil NO/cGMP yolağında cGMP'ı inaktive eden PDE-5 enziminin vasküler düz kas hücrelerinde ve trombositlerdeki spesifik inhibitörüdür. cGMP fosfodiesterazlarla inaktif formu olan GMP'a çevrilir. PDE-5'in

inhibisyonu NO'in etkilerini uzatır. Bu etkisi sonucunda Tadalafil arter ve venlerde vazodilatasyon ve trombosit agregasyonunda inhibisyon yaparak mikrosirkülasyonu düzenler (8,9).

Literatürde Tadalafil ve diğer PDE-5 inhibitörleri ile yapılmış intestinal iskemi reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmaya rastlanmadı. Ancak iskemik hasarı önlemeye yönelik olarak PDE-5 inhibitörlerinden Sildenafil ve Tadalafil ile değişik dokular üzerinde yapılmış çalışmalar mevcuttur.

Sildenafil ve diğer PDE-5 inhibitörlerinin tekrarlayan kardiyak iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olduğuna dair birçok çalışma yapılmıştır (39,40,41). Benzer şekilde Sildenafil ve Vardenafil verilen tavşanlarda kardiyak iskemi reperfüzyon sonrası myokardiyal infarkt büyüklüğünün azaldığı gösterilmiştir (42,43). Sesti ve arkadaşları Tadalafil ile benzer sonuçlar elde etmişlerdir (44).

Ayten, Hasanoğlu ve Uzun yaptıkları çalışmalarda Sildenafil'in kolon anastomoz iyileşmesine olumlu katkı sağladığını göstermişlerdir (45,46,47).

Bizde bu bilgilerden yola çıkarak çalışmamızda intestinal iskemi reperfüzyon hasarını önlemede etkili olacağını öngördüğümüz PDE-5 inhibitörlerinden spesifik, en selektif ve yarılanma ömrü en uzun olan (17,5 saat) Tadalafil'i kullandık. Rat metabolizması insanlara göre yaklaşık 10 kat daha hızlıdır. Bu nedenle Tadalafil ratlara 10mg/kg/gün dozda orogastrik gavaj yolu ile verildi (44).

İnce barsaklarda 20 dakikadan kısa süren iskemi mukozada anlamlı bir değişiklik yapmazken 2 saatten uzun süren iskemi transmural nekroza kadar giden kalıcı hasara neden olabilmektedir (11). Reperfüzyon ise dokular üzerinde, öncesindeki iskemik hasara ek olarak yeni hasar oluşturur (6). İskemi ve reperfüzyon literatüre uygun şekilde Megison ve arkadaşlarının yaptığı tekniğe uygun olarak yapıldı (10).

Barsak anastomozlarında iyileşme mekanik, biyokimyasal ve histopatolojik olarak değerlendirilebilir. Mekanik değerlendirme anastomoz patlama basıncı veya kopma kuvvetine bakılarak yapılırken biyokimyasal değerlendirme anastomoz bölgesindeki kollajenin yapım hızı, miktarı ve özelliklerine bakılarak yapılır (48).

Anastomoz iyileşmesinin mekanik değerlendirmesinde patlama basıncı ölçümü daha sık kullanılır. Çünkü patlama basıncı barsaklardaki fizyolojik gerilimin yansımasıdır ve iyileşmenin ilk günleri esnasında patlama basıncı, anastomoz geriliminin direkt ölçümünü gösterir (32,33,34). Dördüncü günden itibaren yara bölgesinde kollajen yapımı ve birikimi belirginleşmeye başlar ve kollajen miktarındaki artışla birlikte anastomoz kuvvetinde de artış meydana gelir ve geç dönemde patlama basıncı değerleri çok yükselir. Jiborn anastomoz ayrılmasının posoperatif 4. gün anastomoz hattından, postoperatif 7. gün ise bitişikteki sağlam dokudan olduğunu göstermiştir (32). Bizde bu nedenle çalışmamızda anastomoz patlama basınçlarına postoperatif 4. gün baktık.

Yara iyileşmesinin değerlendirilmesinde kollajen düzeyi anlamlı sonuç verir. Kollajen için spesifik kabul edilen hidroksiprolin düzeyinin biyokimyasal yöntemlerle saptanması da, yara iyileşmesi düzeyinin niceliğini sayısal olarak verebilmektedir (35,49). Cronin yaptığı bir çalışmada anastomoz patlama basıncı ölçümlerinde, anastomoz yapıldıktan sonraki üçüncü günden itibaren uygulanacak kuvvetin giderek arttığını ve yedi-onuncu günlerde maksimuma ulaştığını, aynı zamanda ilk üç günde hidroksiprolin konsantrasyonunun anastomoz bölgesinde normalden %40 azaldığını ve daha sonra giderek artarak on-ondördüncü günlerde ise normalin üstüne çıktığını bildirmiştir (50). Bizde çalışmamızda hidroksiprolin düzeylerine kollajen miktarının arttığı postoperatif 4. gün baktık.

Bizim çalışmamızda, intestinal iskemi reperfüzyonun anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilediği literatürle uygun olarak anastomoz patlama basınçları ve perianastomotik doku hidroksiprolin düzeyleri ile tespit edildi. İntestinal iskemi reperfüzyon grubuna Tadalafil verilmesinin anastomoz iyileşmesini olumlu yönde etkilediği anastomoz patlama basınçları ve perianastomotik doku hidroksiprolin değerlerindeki artışla gösterildi.

Ayten ve arkadaşları intraabdominal infeksiyon varlığında intraabdominal adezyon oluşumuna ve sol kolon anastomoz iyileşmesine Sildenafil'in etkisini inceledikleri çalışmalarında; intraperitoneal Sildenafil verilen grupta ortalama anastomoz patlama basınçlarını kontrol grubuna

göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde daha fazla bulurken, hidroksiprolin düzeylerini Sildenafil alan grupta yüksek bulmalarına karşın istatistiksel anlamlılık bulamamışlardır (45).

Hasanoğlu ve arkadaşları Sildenafil sitratın kolon anastomozunda yara iyileşmesine etkisini inceledikleri çalışmalarında Sildenafil verilen ratlarda anastomoz patlama basınçlarını istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulmuşlardır. Ancak perianastomotik doku hidroksiprolin düzeylerinin değerlendirilmesinde gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunamamıştır (46).

Uzun ve arkadaşları iskemik kolon anastomozu iyileşmesi üzerine Sildenafil sitratın etkilerini ve nitrik oksid ile oksidatif stres arasındaki ilişkiyi araştırdıkları çalışmalarında; sildenafil sitratın iskemik anastomotik yara iyileşmesinde NO yolağı üzerinden oksidatif stres üzerine olumlu etkisi olduğunu göstermişlerdir (47).

Zhang ve arkadaşları uzun etkili PDE-5 inhibitörü olan Tadalafil'in ratlardaki embolik stroke modelinde nörolojik fonksiyonlar üzerine etkisini araştırmışlar. Tadalafilin cGMP yolağı üzerinden vasodilatasyon, anjiogenezis ve norogenezisi artırarak nörolojik fonksiyonlarda anlamlı iyileşme sağladığını göstermişlerdir (37).

Oh ve arkadaşlarıda Tadalafil'in lokal enjeksiyonunun aksiyel paternli cilt fleplerinde vazodilatasyon ve anjiogenezisi uyarak flep ömrünü uzattığını göstermişlerdir (38).

Tadalafil'in iskemi reperfüzyon hasarında anastomoz iyileşmesine olumlu katkısı vasküler sistemde vasodilatasyon ve anjiogenezis yaparak, mikrosirkülasyonu düzenleyerek bozulan kan akımı regülasyonunu sağlaması ve NO üzerinden antioksidatif etki göstermesi olabilir.

İlginç olarak normal barsağa anastomoz yapılan ve Tadalafil verilen grupta da anastomoz patlama basınçlarında istatistiksel olarak anlamlı artış saptandı. Tadalafil verilmesinin normal barsağa yapılan anastomoz iyileşmesine de olumlu katkı sağladığı gösterildi. Barsak anastomozu için yapılan mobilizasyon sırasında barsak uçlarında bir miktar devaskülarizasyon sonrası iskemi gelişir. Yara iyileşmesinin ilk evresi olan hemostazis

basamağında başlangıçta lokal damar cevabı vazokonstrüksiyondur. Deneysel işlemlerden 2 saat önce verilen Tadalafil; bu lokal iskemi ve vazokonstrüksiyonu, vasküler sistemde vasodilatasyon ve mikrosirkülasyon düzenleyici etkileri ile önleyerek normal barsağa yapılan anastomoz iyileşmesini de olumlu yönde etkilemiş olabilir.

Histopatolojik incelemede gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı fark tespit edilemedi. Bunun sebebi yara iyileşmesinin optimum göstergelerinin histopatolojik olarak postoperatif beşinci günden sonra belirginleşmesi olabilir (51).

Sonuç olarak; Tadalafil'in perianastomotik doku hidroksiprolin miktarını arttırarak ve patlama basıncı değerlerinde olumlu değişimle beraber intestinal iskemi reperfüzyon sonrası ince barsak anastomoz iyileşmesine, normal anastomoz iyileşmesine göre daha olumlu etkisi olduğu söylenebilir. Klinikte değişik nedenlerle çok sık karşılaştığımız mezenterik iskemi nedeniyle yapılmak zorunda kalınan ince barsak rezeksiyonu ve anastomozlarında yara iyileşmesinin problemsiz olması, operasyonlardan sonra ortaya çıkabilecek anastomoz kaçağı komplikasyonlarını önleyebileceği gibi hastanede yatış sürelerini de kısaltabilir. Tadalafil'in moleküler etki mekanizmasını tam olarak açıklamak ve en fazla ne kadar süre ile olan iskemi reperfüzyon hasarında, hangi dozda etkili olduğunu ortaya koyabilmek için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

VI. SONUÇ VE ÖNERİLER

İntestinal iskemi reperfüzyon oluşturulan ratlarda Tadalafil'in ince barsak anastomoz iyileşmesine etkisini araştırdığımız çalışmamızda, Tadalafilin;

Normal anastomoz iyileşmesine göre intestinal iskemi reperfüzyon hasarına uğramış barsaklardaki anastomoz iyileşmesini daha olumlu yönde etkilediği anastomoz patlama basınçları ve perianastomotik doku hidroksiprolin değerlerindeki artışla gösterildi. Ancak bunun hangi moleküler mekanizmalar üzerinden ve en fazla ne kadar süre ile intestinal iskemi reperfüzyon hasarına uğramış barsakta, hangi dozda etkili olduğunun gösterilmesi için yeni çalışmalara ihtiyaç vardır.

İntestinal iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde etkili ve anastomoz iyileşmesine katkıda bulunduğunu öngördüğümüz spesifik PDE-5 inhibitörleri üzerine daha detaylı ve kapsamlı araştırmalar yapılması ile gelecekte cerrahinin büyük problemlerinden biri olan intestinal iskemi reperfüzyon hasarına uğramış barsaklarda yapılan anastomozlarda oluşan anastomoz sorunlarını önlemeye yönelik önemli kazanımlar elde edeceğimizi düşünmekteyiz.

VII. ÖZET

Gastrointestinal sistem cerrahisi sonrasında mortalite ve morbiditeden sorumlu faktörler içerisinde anastomoz kaçakları halen ilk sırada yer almaktadır. İnce barsak iskemi ve reperfüzyon hasarının anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilediği gösterilmiştir. Bu nedenle günümüzde ince barsak iskemi reperfüzyon hasarının olumsuz etkilerini önleyebilecek yada oluşan olumsuz etkileri geri çevirebilecek bir ilaç bulmaya yönelik araştırmalara araştırmacıların ilgisi devam etmektedir.

Bu çalışmada, vasküler düz kaslarda vazodilatasyon yaparak kan akımını arttıran ve trombosit agregasyonunu inhibe ederek mikrosirkülasyonu düzenleyen Tadalafil'in intestinal iskemi reperfüzyon oluşturulan ratlarda ince barsak anastomoz iyileşmesi üzerine etkisini araştırmayı amaçladık.

Çalışmada ortalama ağırlıkları 200-250 gram olan erkek cinsi Sprague-Dawley tipi ratlar kullanıldı. Ratlar rastgele seçilerek dört gruba ayrıldı. Grup I'de normal barsağa anastomoz, Grup II'de normal barsağa anastomoz + Tadalafil, Grup III'de intestinal iskemi reperfüzyon + anastomoz, Grup IV'de intestinal iskemi reperfüzyon + anastomoz + Tadalafil uygulandı. Grup III ve IV'de süperior mezenterik arter ve ince barsağa gelen kollateral damarlar klemplenerek 30 dakika iskemi sonrası reperfüzyon sağlandı. Grup II ve IV'e çalışmanın başlangıcından 2 saat önce başlanarak 4 gün 10mg/kg/gün oral yolla Tadalafil verildi. Anastomoz iyileşmesini değerlendirmek üzere postoperatif 4. gün ratlar sakrifiye edilerek anastomoz patlama basınçları ölçüldü, histopatolojik inceleme ve perianastomotik doku hidroksiprolin düzeyi ölçümü için doku örnekleri alındı. Hidroksiprolin

düzeyleri biyokimyasal olarak ölçüldü. Anastomoz hattı histopatolojik olarak modifiye Ehrlich-Hunt skorlaması ile değerlendirildi. İstatistiksel değerlendirmeler “SPSS 16.0 for Windows” paket programında Anova ve Tukey testleri kullanılarak yapıldı ve $p < 0,05$ değerleri anlamlı kabul edildi.

Anastomoz patlama basınçları grup II’de grup I’e göre ve grup IV’de grup III’e göre yüksek bulundu ($p:0,041$ ve $p:0,000$). Hidroksiprolin değerleri grup II’de grup I’e göre yüksek bulundu ancak istatistiksel anlamlılık saptanmadı ($p:0,081$) buna karşın grup IV’de grup III’e göre istatistiksel olarak anlamlı düzeyde yüksek bulundu ($p:0,000$).

30 dakikalık intestinal iskemi reperfüzyonun ince barsak anastomoz iyileşmesini olumsuz etkilediği literatüre uygun olarak anastomoz patlama basıncı ve perianastomotik doku hidroksiprolin düzeyi ölçümü ile gösterildi. Tadalafil’in normal barsağa anastomoz yapıldığında anastomoz iyileşmesine olumlu etkisi anastomoz patlama basıncı ölçümü ile gösterildi. İntestinal iskemi reperfüzyon hasarına uğrayan ince barsaklarda Tadalafil’in anastomoz iyileşmesini olumlu yönde etkilediği hem anastomoz patlama basınçları ile hem de perianastomotik doku hidroksiprolin değerleriyle gösterildi.

Sonuçta; İntestinal iskemi reperfüzyon hasarına maruz kalan ince barsaklarda Tadalafil’in operasyondan 2 saat önce başlanarak 4 gün 10 mg/kg/gün dozunda verilmesiyle anastomoz iyileşmesini olumlu etkilediği gösterildi.

Yapılacak yeni çalışmalar ışığında Tadalafil’in etki mekanizması, kullanım dozu ve en fazla ne kadar süre ile oluşan iskemi reperfüzyon hasarında etkili olduğu daha iyi anlaşılabacaktır.

VIII. THE EFFECT OF TADALAFIL ON THE HEALING PROCESS OF THE INTESTINAL ANASTOMOSIS WITH ISCHEMIA AND REPERFUSION IN RATS

Anastomotic leakage still takes the first place among the factors responsible from morbidity and mortality in gastrointestinal surgery. Intestinal ischemia and reperfusion injury has been reported to have negative effect on anastomotic healing process. There is an interest among investigators for the investigations that can find a drug which can prevent the negative effects of small bowel ischemia-reperfusion injury or revert this process.

In this study we aimed to investigate the effect of Tadalafil, a drug which is a vasodilator agent on vascular smooth muscles and also repair the microcirculation by inhibiting the platelet aggregation, on the healing process of small bowel anastomosis in the intestinal ischemia-reperfusion model of rats.

In this study forty-eight male Sprague-Dawley rats (body weight 200-250 gr) were used. The rats are randomly divided into four groups. The first group has normal small bowel anastomosis, the second group has normal small bowel anastomosis and tadalafil treatment, the third group has intestinal ischemia-reperfusion and small bowel anastomosis, and the fourth group has intestinal ischemia-reperfusion, small bowel anastomosis and Tadalafil treatment. In order to make intestinal ischemia and reperfusion the superior mesenteric artery and collateral vessels to the small bowel were clamped for 30 minutes and then released in groups III and IV. In groups II and IV tadalafil was given orally, started 2 hours prior to the operation and

continued for 4 days at 10 mg/kg/day dosage. Four days after the operation the rats were sacrificed and their anastomotic bursting pressures were measured. Tissue samples for the histopathological evaluation and the measurement of hydroxyproline levels were collected in order to evaluate the healing of anastomosis. Hydroxyproline levels were measured with biochemical assay. For histopathologic evaluation, modified Ehrlich-Hunt scoring system is used. For the statistical analysis, SSPS 16.0 for Windows, with Anova and Tukey presets, is used and values $p < 0.05$ are considered significant.

Anastomotic bursting pressures in group II were found to be higher than in group I ($p:0.041$). This was also true for group IV against group III ($p:0.000$). Hydroxyproline levels of the perianastomotic tissue were found to be higher in group II than group I but with no statistical significance ($p:0.081$) but in group IV against group III it also posed a statistical significance ($p:0.000$).

It has been shown that 30 minutes of intestinal ischemia and reperfusion has negatively affected the anastomotic healing shown by anastomotic bursting pressure and perianastomotic tissue levels of hydroxyproline matching with the literature. Tadalafil's positive effects on the healing normal anastomosis was shown with anastomotic bursting pressure. In anastomosis with intestinal ischemia and reperfusion injury, Tadalafil's positive effects on healing process was shown by both the anastomotic bursting pressure and perianastomotic tissue hydroxyproline levels.

In conclusion: Tadalafil was shown to have positive effect on the healing process of anastomosis at dose of 10/mg/kg/day beginning 2 hours prior to the operation and continued for 4 days.

In future studies Tadalafil's effect mechanisms, dosage and the borders of its effect on ischemia – reperfusion injury will be further understood.

IX. KAYNAKLAR

1. Kuzu MA, Köksoy C, Kale IT, Tanik A, Terzi C, Elhan AH, Reperfusion injury delays healing of intestinal anastomosis in a rat. *Am J of Surgery* 1998; 176: 348-351.
2. Tullis MJ, Brown S, Gewertz BL. Hepatic influence on pulmonary neutrophil sequestration following intestinal ischemia-reperfusion. *J Surg Res* 1996; 66: 143-146.
3. Cantürk N.Z., Sayek İ. Cerrahi araştırma kitabı. Nobel Tıp Kitabevleri, 2005:357-365.
4. Sorkine P, Szold O, Halpern P, Gutman M, Greemland M, Rudick V, Goldman G. Gut decontamination reduces bowel ischemia-induced lung injury in rats. *Chest* 1997; 112: 491-495.
5. Grotz MRW, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q. Intestinal cytokine response after gut ischemia Role of gut barrier failure, *Ann Surg* 1999; 229: 478-486.
6. Grace PA. Ischaemia-reperfusion injury. *British J of Surgery* 1994; 81: 637-647.
7. Souza DG, Cara DC, Casalli GD, Coutinho SF, Silveira MR, Andrade SP, Poole SP, Teixeira MM. Effects of the PAF receptor antagonists UK74505 on local and remote reperfusion injuries following ischaemia of the superior mesenteric artery in the rat. *British Journal of Pharmacology* 2000; 131: 1800-1808.
8. Li Z, Xi X, Gu M, et al. A Stimulatory role for cGMP-dependent protein kinase in platelet activation. *Cell* 2003; 112:77-86.

9. Bischoff E. Potency, selectivity, and consequences of nonselectivity of PDE inhibition. *Int J Import Res* 2004; 16(Suppl 1):S11-14.
10. Megison SM, Horton JW, Chao H, Walker PB. A new model for intestinal ischemia in the rat. *J Surg Res* 1990; 49: 168-173.
11. Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion. *Surgery* 1990; 107:574-80.
12. Semenza GL. Cellular and molecular dissection of reperfusion injury ROS within and without. *Circ Res.* 2000; 86: 117-118.
13. Bathe OF, Chow AWC, Phang PT. Splachnic origin of cytokines in a porcine model of mesenteric ischemia-reperfusion. *Surgery* 1998; 123;1: 79-88.
14. Ertan T, Soran A, Kılıç M, Aslar AK, Koç M, Cengiz Ö. Kan Malondialdehid ve total antioksidan seviyesinin önemi. *Cerrahi Tıp Bülteni* 2001; 2;4: 154-167.
15. Girotti AW. Lipid hydroperoxide generation, turnover, and effector action in biological systems. *J Lipid Res.* 2000; 39:1529-1542.
16. Lefer AM., Lefer DJ. Pharmacology of the endothelium in ischemia reperfusion and circulatory shock. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 71-90.
17. Murad F. Cyclic guanosine monophosphate as a mediator of vasodilation. *J Clin Invest* 1986; 78,1-5.
18. Palmer RMJ., Ferrige AG., Moncado S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 1987; 327: 524-6.
19. Granger DN, Stokes KY. Role of Nitric Oxide in Ischemia-Reperfusion Injury. Ignarro LJ (Ed). *Nitric Oxide Biology and Pathobiology.* Academic Press London,UK, 2000; 633-647.
20. Lefer AM. Nitric Oxide: A Critical Determinant in Ischemia-Reperfusion. Ignarro LJ (Ed). *Nitric Oxide Biology and Pathobiology.* Academic Press London, UK, 2000; 649-660.

21. Luo JD, Chen AF. Nitric oxide: a newly discovered function on wound healing. *Acta Pharmacol Sin* 2005; 26:259-264.
22. Efron DT, Thornton FJ, Steultens C et al. Expression and function of inducible nitric oxide synthase during rat colon anastomotic healing. *J Gastrointest Surg* 1999; 3:592-601.
23. Vlasov TD, Smirnov DA, Nutfullina GM. Preconditioning of the small intestine to ischemia in rats. *Neuroscience and Behavioral Physiology*. 2002; 34:118-124.
24. Frank J, Thornton. Healing in the Gastrointestinal Tract, Adrian Barbul, *The Surgical Clinics of North America*, Volume 77, Number 3, June 1997; 549-565.
25. Chung RS. Blood flow in colonic anastomoses. Effect of stapling and suturing. *Ann Surg* 1987; 206:335.
26. Hongstrom H, Haglund U, Zederfeldt B. Tension leads to increased neutrophil accumulation and decreased laparotomy wound strength. *Surgery* 1990; 107:215.
27. Shikata J, Shida T. Effects of tension on local blood flow in experimental intestinal anastomoses. *J Surg Res* 1986; 40:105.
28. Shandal A, Lowdes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg* 1985; 72:606.
29. Foster ME, Laycock JR, Silver IA, et al: Hypovolemia and healing in colonic anastomoses. *Br J Surg* 1985; 72:831.
30. Carrico TL, Mehrhof AJ, Cohen IK. Biology of wound healing. *Surg Clin North Am* 1984; 64:721.
31. Sharma R. Novel phosphodiesterase-5 inhibitors: current indications and future directions. *Indian J Med Sci. Review*. 2007 Dec; 61(12):667-79.
32. Jiborn H, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses. I. Bursting strength of the colon after left colon resection and anastomosis. *Am J Surg*. 1978; 136: 587-594.
33. Biert J, Seifert W, Man B, Wobbles T, Hoogenhout J, Hendriks T. Combined preoperative irradiation and local hyperthermia delays

- early healing of experimental colonic anastomoses. *Arch Surg.* 1996; 131: 1037-1042.
34. Mansson P, Zhang XW, Jeppsson B, Thorlacius H. Anastomotic healing in the rat colon: comparison between a radiological method, breaking strength and bursting pressure. *Int J Colorectal Dis.* 2002; 17: 420-425.
 35. Bergman, I., Loxley, R. Two Improved and Simplified Methods for Spectrophotometric Determination of Hydroxyprolin. *Anal. Chem.* 1963; 35:1961-1964.
 36. Ehrlich HP, Tarver H, Hunt TK. Effects of vitamin A and glucocorticoids upon inflammation and collagen synthesis. *Ann Surg* 1973; 177:222-7.
 37. Zhang L, Zhang Z, Zhang RL, Cui Y, LaPointe MC, Silver B, Chopp M. Tadalafil, a long-acting type 5 phosphodiesterase isoenzyme inhibitor, improves neurological functional recovery in a rat model of embolic stroke. *Brain Res.* 2006 Nov 6; 1118(1):192-8.
 38. Oh M, Chang H, Minn KW. The effects of tadalafil on axial-pattern skin flap survival rats. *Dermatol Surg.* 2008 May;34(5):626-30.
 39. Kukreja RC, Ockaili R, Salloum F, Yin C, Hawkins J, Das et al. Cardioprotection with phosphodiesterase-5 inhibition-a novel preconditioning strategy. *J Mol Cell Cardiol* 2004; 36:165-173.
 40. Kukreja RC, Salloum F, Das A, Ockaili R, Yin C, Bremer YA et al. Pharmacological preconditioning with sildenafil: basic mechanisms and clinical implications. *Vascul Pharmacol* 2005; 42:219-232.
 41. Das A, Smolenski A, Lohmann SM, Kukreja RC. Cyclic GMP dependent protein kinase Ia attenuates necrosis and apoptosis following ischemia/reoxygenation in cardiomyocytes. *J Biol Chem* 2006; 281:38644-38652.
 42. Ockaili R, Salloum F, Hawkins J, Kukreja RC. Sildenafil(Viagra) induces powerful cardioprotective effect via opening of mitochondrial K-ATP channels in rabbits. *Am J Physiol* 2002; 283:H1263-H1269.

43. Salloum F, Ockaili R, Daoud VP, Marwaha VR, Kukreja RC. Vardenafil: a novel type 5 phosphodiesterase inhibitor reduces myocardial infarct size following ischemia/reperfusion injury via opening of mitochondrial K-ATP channels in rabbits. *J Mol Cell Cardiol* 2006; 40:405-411.
44. Sesti C, Florio V, Johnson EG, Kloner RA(2006). The phosphodiesterase-5 inhibitor Tadalafil reduces myocardial infarct size. *Int J Import Res.* 2007 Mar-Apr; 19(2):226-7.
45. Ayten R, Çetinkaya Z, Girgin M, Özeran İ, Üstündağ B, Aygen E. The effects of intraperitoneal sildenafil administration on healing of left colonic anastomoses and intraabdominal adhesion formation in the presence of intraabdominal infection. *Dis Colon Rectum.* 2008 Dec; 51(12):1837-41.
46. Hasanoğlu A, Erkan S, Temel S, Urhan MK, Güler O. Sildenafil sitratın kolon anastomozundaki yara iyileşmesi üzerine etkisi. *Turkish Medical Journal* 2007;1:66-75.
47. Uzun H, Konukoğlu D, Nuri M.K, Ersoy E.Y, Özcevik S, Yavuz N. The effects of sildenafil citrate on Ischemic colonic anastomotic healing in rats: Its relationship between nitric oxide and oxidative stres. *World J Surg* 2008; 32:2107-2113.
48. Hendriks T, Mastboom WJB. Healing of experimental intestinal anastomoses. *Dis Colon Rectum.* 1990; 33:891-901.
49. Cohen I.K, Moore, C.D, Dielgelmann RF: Onset and lokalization of collagen synthesis during wound healing in open rat skin wounds. *Proce. Of the Socie. For Exp.Biol.Med* 1979; 160:458-462.
50. Gainant A. Prevention of anastomotic dehiscence in colorectal surgery. *J Chir(Paris)*2000 feb;137(1):45-50.
51. Attard JA, Raval MJ, Martin GR et al. The effects of systemic hypoxia on colon anastomotic healing: an animal model. *Dis Colon Rectum* 2005; 48:1460-1470.