



T.C.

DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ

PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI

BAŞKANLIĞI

**RAT TRAM KAS-DERİ FLEBİNDE SPİNAL ve EPİDURAL
ANESTEZİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

**Dr. YUSUF ACAR
TIPTA UZMANLIK TEZİ**

DİYARBAKIR – 2011



T.C.
DİCLE ÜNİVERSİTESİ TIP FAKÜLTESİ
PLASTİK, REKONSTRÜKTİF ve ESTETİK CERRAHİ ANABİLİM DALI BAŞKANLIĞI

**RAT TRAM KAS-DERİ FLEBİNDE SPİNAL ve EPİDURAL
ANESTEZİNİN İSKEMİ REPERFÜZYON HASARI ÜZERİNE
ETKİLERİNİN KARŞILAŞTIRILMASI**

Dr. YUSUF ACAR
TIPTA UZMANLIK TEZİ

Doç. Dr. MEHMET BOZKURT
(TEZ DANIŞMANI)

DİYARBAKIR – 2011

ÖNSÖZ

“Rat TRAM Kas-deri Flebinde Spinal ve Epidural Anestezinin İskemi ve Reperfüzyon Hasarı Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması” adlı uzmanlık tezi Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Başkanlığının 15 Mart 2010 gün ve 201 sayılı yazısı ile verilmiş, 31 Mayıs 2010 tarih ve 2010/11 sayı ile etik kurul onayı alınıp çalışmaya başlanmıştır.

Bu çalışmada transvers rektus abdominis myokütan flep modeli kullanılarak vasküler pediküllü sağlam iskelet kası oluşturulup spinal ve epidural anestezinin iskemi-reperfüzyon hasarını azaltıcı etkileri karşılaştırılmıştır. Literatürdeki çalışmalar incelendiğinde iskemi-reperfüzyon hasarını azaltması amacıyla bir çok ajan ve fiziksel yöntem kullanılmasına rağmen anestezik tekniklerle ilgili yapılan çalışmaların neredeyse hiç olmadığı ve özellikle mikrocerrahi ve rekonstrüktif prosedürler amacıyla kullanılan bu yöntemlerle ilgili ayrıntılı çalışmalara ihtiyaç duyulduğu gözlenmektedir. Yapılacak bu çalışma herhangi bir nedenle kas dokusundaki oluşan iskemi ve reperfüzyon hasarını azaltmada alternatif bir tedavi yöntemi olarak listedeki yerini alacağı düşünülmektedir.

Uzmanlık eğitimim boyunca ve bu çalışmanın gerçekleştirilmesinde çok değerli destek ve yardımlarını gördüğüm, bilgi ve görgüsünden yararlandığım Anabilim Dalı Başkanımız Doç. Dr. Mehmet Bozkurt’a, biyokimyasal analizleri gerçekleştiren Prof. Dr. Fatma Birgül Işık ve Arş. Gör. Dr. Beri Hocaoglu Bozaslan’a, histopatolojik preparatların değerlendirilmesini ve incelenmesini üstlenen Yrd. Doç. Dr. Uğur Fırat’a, elde edilen bulguların yorumlanmasında ve istatistiksel değerlendirmelerde yardımlarını esirgemeyen Prof Dr. Ömer Satıcı’ya, deney hayvanı laboratuvarı çalışanlarına, tüm uzmanlık öğrencisi arkadaşlarıma, klinik görevli arkadaşlarıma, her zaman bana destek olan sevgili anneme ve babama ve sevgili ablama, her an yanımda olan sevgili eşim Esin’e ve oğlum Mehmet Efe’ye sonsuz saygı, sevgi ve teşekkürlerimi sunuyorum.

ÖZET

Amaç: İskemi ve reperfüzyon hasarını azaltmada olumlu etkileri olduğu ileri sürülen spinal ve epidural anestezinin; deneysel olarak serbest kas aktarımını ifade eden bir modelde iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini incelemektir.

Metod: Çalışmada 40 rat dört gruba ayrıldı. Birinci grup (n=10) iskemi yapılmayan grup (Sham), ikinci grup iskemi reperfüzyon grubu (İ/R, kontrol, n=10), üçüncü grup (n=10) epidural anestezi grubu, dördüncü grup (n=10) spinal anestezi grubuydu. Deneklerde tüm gruplarda TRAM kas-deri flebi oluşturulup sonrasında sham grubu hariç tüm gruplarda dört saatlik normotermik no-flow iskemi, iki saatlik reperfüzyon uygulandı. Cerrahi sonrasında alınan biyopsilerde hyalinizasyon, nükleer değişiklik ve enflamasyon ölçümleri ile histopatolojik ve total antioksidan statü (TAS), total oksidatif stress (TOS), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) ve PON ölçümleri ile biyokimyasal değerlendirme yapıldı.

Bulgular: Biyokimyasal incelemede epidural grubunda MDA düzeylerinin İ/R grubuna göre anlamlı seviyede düşük, PON seviyesinin ise anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (p:0.037, p:0.028). Spinal grubunun total oksidatif stress düzeylerinin epidural grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu, İ/R grubunun da TOS düzeylerinin epidural grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (p:0,045; p:0,001). Epidural grubunun total antioksidan kapasite düzeylerinin spinal ve İ/R gruplarından anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır (p:0,001; p:0,001). Gruplar arasında nitrik oksit seviyeleri arasında anlamlı farklılık bulunmamaktadır (p>0.05). Patolojik incelemede spinal grubunda minimal enflamasyon bulguları epidural grubuna göre daha yüksek saptandı (p:0.001). Spinal grubunda nükleer değişiklik oranı İ/R ve Epidural grubuna göre daha yüksek saptandı (p<0.01). Gruplar arasında hyalinizasyon açısından anlamlı farklılık saptanmadı (p>0.05).

Sonuç: Çalışmadan elde edilen bulgular sonucunda, epidural anestezinin iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada spinal anesteziden daha etkili ve yararlı bir anestezi yöntemi olduğu ve klinik uygulamalarda güvenle kullanılabileceği düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler; İskemi-reperfüzyon, epidural anestezi, spinal anestezi, kas flebi, mikrocerrahi

ABSTRACT

The Effects of Ischemia-Reperfusion (I/R) Injury and Epidural/Spinal Anaesthesia on Transvers Rectus Abdominis Musculocutaneous (TRAM) Flap: Experimental Study

Background: In microsurgical procedures, the choice of appropriate anaesthetic technique is important for providing surgical success. The purpose of this experimental study is to compare spinal and epidural anaesthesia on the rat TRAM flap model which is denotative of experimental muscle flap transfer ischemiareperfusion injury.

Method: Fourty male Sprague-Dawley rat was divided into 4 experimental groups containing 10 animal each. Animals were divided into Group I (Sham, n=10), group II (I/R, spinal anaesthesia, n=10), Group III (I/R, Epidural anaesthesia, n=10) and Group IV (I/R, control, n=10). TRAM musculocutaneous flap was occurred in all groups. At the end of the surgery; hyalinization, nuclear changes and inflammation rates for histopathological evaluation and total antioksidan state (TAS), total oxidative stress (TOS), malonyldialdehyde (MDA), nitric oxide (NO), paraxonase (PON) measurements for biochemical evaluation were evaluated on tissue samples obtained from muscle tissue.

Results: Biochemical investigations showed that MDA level was significantly lower in epidural group when compared with I/R group and PON level was significantly higher in epidural group when compared with I/R group (p:0.037, p:0.028). TOS level significantly increased in spinal group when compared with epidural group and in I/R group when compared with epidural group (p:0,045; p:0,001). In epidural group, TAS level was significantly higher than spinal, I/R groups (p:0,001; p:0,001). There was no significant difference between of groups in terms of NO level (p>0.05). Pathological evaluation showed that minimal inflammation findings were significantly higher in spinal group comparing with epidural group (p:0.001). Nuclear change rate was significantly higher in spinal group when compared with I/R and epidural group (p<0.01). There was no significant difference between groups in terms of hyalinisation (p>0.05).

Conclusion: In the presented study, MDA level, basic derivative of lipid peroxidation; and oxidative stress significantly decreased in epidural anaesthesia. In other words, epidural anaesthesia provide more efficient free radical scavenger by increasing total antioxidant capacity. Histopathologically, nuclear migration to center, hyalinization with globular changes, degeneration of fibers and inflammation is seen during I/R injury. Our findings indicate that epidural anaesthesia can be considered as a suitable choice of anaesthetic method for decreasing ischemia reperfusion injury of muscle flaps.

Key words: Muscle flap, Ischemia-reperfusion injury, epidural anesthesia, spinal anesthesia, microsurgery

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
ÖNSÖZ.....	i
ÖZET.....	ii
İNGİLİZCE ÖZET (ABSTRACT).....	iii
KISALTMALAR LİSTESİ.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	ix
1. GİRİŞ ve AMAÇ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kas Flepleri.....	4
2.2. Rektus Abdominis Kas-Deri Flepleri.....	5
2.2.1. Anatomi.....	7
2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı.....	9
2.3.1. İskemi.....	9
2.3.2. Reperfüzyon.....	11
2.3.3. İskemi reperfüzyon hasar mekanizmaları.....	15
2.3.3.1. Serbest oksijen radikalleri.....	15
2.3.3.2. Polimorf nüveli lökositler.....	17
2.3.3.3. Komplemanın rolü.....	20
2.3.3.4. Endotel hücresinin rolü.....	21
2.4. Flep Cerrahisi ve Anestezi.....	22
2.4.1. Fizyolojik prensipler.....	22
2.4.2. Mikrosirkülasyon.....	23
2.4.3. Arteriyel basıncın kontrolü.....	23
2.4.4. Karbondioksit kontrolü.....	24
2.4.5. Isı kontrolü.....	24
2.4.6. Ağrının kontrolü.....	24

2.5. Flep Cerrahisinde Anestezi Yöntemleri.....	25
2.5.1. İnhalasyon anestezi.....	25
2.5.2. Total intravenöz anestezi.....	27
2.5.3. Bölgesel anestezi.....	28
2.5.3.1. Epidural anestezi.....	28
2.5.3.2. Spinal anestezi.....	29
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	30
3.1. Deney Planı.....	30
3.2. Deney Grupları.....	31
3.2.1. Grup I (Sham grubu).....	32
3.2.2. Grup II (İ/R, Kontrol grubu).....	32
3.2.3. Grup III (Epidural anestezi grubu).....	32
3.2.4. Grup IV (Spinal anestezi grubu).....	33
3.3. Flep Modeli.....	33
3.4. Bölgesel Anestezi Modelleri.....	36
3.4.1. Epidural anestezi modeli.....	36
3.4.2. Spinal anestezi modeli.....	39
3.5. Biyokimyasal Ölçümler.....	41
3.5.1. Malondialdehit (MDA) doku düzeyi ölçümü.....	41
3.5.2. Paraoksonaz (PON) doku düzeyi ölçümü.....	42
3.5.3. Nitrik oksit doku düzeyi ölçümü.....	43
3.5.4. Total antioksidan kapasite (TAK) doku düzeyi ölçümü.....	43
3.5.5. Total oksidatif stres (TOS) doku düzeyi ölçümü.....	45
3.6. Histopatolojik Değerlendirme.....	45
3.7. İstatiksel Değerlendirme.....	47
4. BULGULAR.....	48
4.1. Biyokimyasal Ölçümler.....	48
4.1.1. Malondialdehit (MDA) sonuçları.....	48

4.1.2. Paraoksonaz (PON) sonuçları.....	50
4.1.3. Nitrik oksit (NO) sonuçları.....	52
4.1.4. Total antioksidan kapasite (TAK) sonuçları.....	53
4.1.5. Total oksidatif stres (TOS) sonuçları.....	55
4.2. Histopatolojik Çalışma.....	57
4.2.1. Enflamasyon sonuçları.....	60
4.2.2. Nükleer değişiklik oranları.....	62
4.2.3. Hyalinizasyon sonuçları.....	64
5. TARTIŞMA.....	66
6. SONUÇ.....	77
7. KAYNAKLAR.....	78

KISALTMALAR LİSTESİ

ACTH; Adrenokortikotropik hormon

ATP; Adenosine tri phosphate (Adenozin tri fosfat)

BHT; Butylated hydroxytoluene (Bütile hidroksitoluen)

cGMP; Siklik guanosine monophosphate (siklik guanozin monofosfat)

DÜSAM; Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Selahattin Payzın Deneysel Araştırma Merkezi

DNA; Deoksiribonükleik asit

eNOS; Endotelial nitrik oksit sentaz

ET; Endotelin

FGF; Fibroblast growth factor (fibroblast büyüme faktörü)

HIF-1; Hypoxia inducible factor (hipoksi indükleyici faktör)

HTLaz; Homosistein tiyolaktonaz

IL; Interleukine (interlökin)

ICAM-1; Intercellular adhesion molecule (endotel interselüler adezyon molekülü)

İ/R; İskemi-reperfüzyon

iNOS; İndükleyici nitrik oksit sentaz

KD; Ksantin dehidrogenaz

KO; Ksantin oksidoredüktaz

LT; Lökotrien

LDL; Low density lipoprotein (düşük dansiteli lipoprotein)

MIP; Makrofaj enflamatuvar protein

MDA; Malondialdehit

NO; nitrik oksit

NADPH; Nikotinamidadenindinükleotid fosfat dehidrogenaz

NOS; Nitrik oksit sentaz

nNOS; Nöral nitrik oksit sentaz

NF- κ B; Nükleer transkripsiyon faktörü

PAF; Platelet activating factor (Trombosit aktivite edici faktör)

PGE1; Prostaglandin E1

PECAM 1; Platelet-endothel intercellular adhesion molecule (Trombosit endotel hücresi adezyon molekülü)

PDGF; Platelet derived growth factor (Trombosit eldesi büyüme faktörü)

PNL; Polimorf nüveli lökosit

PON; Paraoksonaz

ROT; Reaktif oksijen radikali

SOR; Serbest oksijen radikali

SOD; Süperoksit dismutaz

TNF; Tumor necrosis factor (tümör nekroz faktör)

TPA; Tissue plasminogen activator (doku plasminojen aktivatörü)

TGF; Transforming growth factor (transforme edici büyüme faktörü)

TxA2; Tromboksan A2

TAK; Total antioksidan kapasite

TOS; Total oksidatif stres

TRAM; Transvers rektus abdominis myok tan

TBA; Tiyoarbit rik asit

TCA; Trikloroasetik asit

VEGF; Vascular endothelial growth factor (Vasküler endotelial büyüme faktörü)

VCAM; Vascular cell adhesion molecule (vasküler hücre adezyon molekülü)

ŞEKİL LİSTESİ

	Sayfa no
Şekil 1: Kas fleplerinin kanlanma şekillerine göre Mathes-Nahai sınıflaması.....	5
Şekil 2: Rektus abdominis flebinde süperior ve inferior derin epigastrik Arterler.....	6
Şekil 3: Rektus abdominis kas flebinin anatomisi.....	8
Şekil 4: Oksijen paradoksu; moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksitle ilişkisi.....	14
Şekil 5: İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi.....	16
Şekil 6: Lökosit- endotel etkileşiminde lökosit adhezyon molekülleri ve lökosit göçünün şematize edilmesi	18
Şekil 7: TRAM flebinin kaldırılması amacıyla planlanan deri insizyonu.....	34
Şekil 8: Flebin oluşturulması ve ön karın duvarının onarılması.....	35
Şekil 9: TRAM flebini besleyen derin süperior epigastrik arterin görünümü	35
Şekil 10: Epidural anestezi amacıyla planlanan deri insizyonu ve paravertebral fasya.....	36
Şekil 11: L4-L5 vertebra ve duranın görünümü.....	36
Şekil 12: Polietilen tüpün yerleştirilmesi ve spinöz proseslere fiksasyonu.....	37
Şekil 13: TISSEEL VH(buharla steril edilmiş iki bileşenli bir fibrin yapıştırıcısı):	37
Şekil 14: Vertebrada açılan deliğin kapatılması amacıyla fibrin matriks yerleştirilmesi.....	38
Şekil 15: Paravertebral kas ve fasya ile yapılan insizyonun primer onarımı.....	38
Şekil 16: Kateterizasyon amacıyla yerleştirilen polietilen tüp tünelize edilerek kulak arkasından çıkarılması.....	39
Şekil 17: Spinal anestezi için planlanan deri insizyonu.....	39
Şekil 18: L4-L5 vertebralardan girilerek spinöz proseslerin eksizyonunu Takiben kemikte deliğin açılması.....	40

Şekil 19: Duranın yırtılıp dura altından polietilen tüpün yerleştirilmesi.....:	41
Şekil 20: Gruplara göre MDA düzeyleri.....:	49
Şekil 21: Gruplara göre PON düzeyleri.....:	51
Şekil 22: Gruplara göre total antioksidan kapasite düzeyleri.....:	54
Şekil 23: Gruplara göre total oksidatif stres düzeyleri.....:	56
Şekil 24: Sham grubunda çizgili kas dokusunun mikroskopik görünümü (H&E boyama, ×200).....:	57
Şekil 25: İ/R grubunda çizgili kas dokusunun mikroskopik görünümü (H&E boyama, ×200).....:	58
Şekil 26: İ/R grubunda enflamasyon ve hyalinizasyonun mikroskopik görünümü (H&E boyama, ×200).....:	58
Şekil 27: Spinal anestezi grubunda bazı kas liflerinde dejenerasyon ile enflamasyon ve merkeze nükleer göçün mikroskopik görünümü.....:	59
Şekil 28: Spinal anestezi grubunda kas liflerinde düzensizlikle hyalinize globüler değişikliklerin mikroskopik görünümü.....:	59
Şekil 29: Epidural anestezi grubunda dokularda enflamasyon ve hyalinizasyonun mikroskopik görünümü.....:	60
Şekil 30: Gruplara göre enflamasyon dağılımı.....:	62
Şekil 31: Gruplara göre nükleer değişiklik dağılımı.....:	63
Şekil 32: Gruplara göre hyalinizasyon dağılımı.....:	65

TABLO LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 1: Serbest oksijen radikalleri ve kimyasal gösterimleri.....	17
Tablo 2: Deney planı ve gruplar.....	31
Tablo 3: Total antioksidan kapasite (TAK) ölçüm formatı.....	44
Tablo 4: Gruplarda MDA düzeyleri.....	48
Tablo 5: Gruplara göre MDA değerlendirmesi.....	49
Tablo 6: Gruplarda PON 1 düzeyleri.....	50
Tablo 7: Gruplara göre PON 1 değerlendirmesi.....	51
Tablo 8: Gruplarda NO düzeyleri.....	52
Tablo 9: Gruplara göre Nitrik oksit değerlendirmesi.....	52
Tablo 10: Gruplarda TAK düzeyleri.....	53
Tablo 11: Gruplara göre total antioksidan kapasite değerlendirmesi.....	53
Tablo 12: Gruplarda TOS düzeyleri.....	55
Tablo 13: Gruplara göre total oksidatif stres değerlendirmesi.....	56
Tablo 14: Gruplarda enflamasyon bulguları sonuçları.....	61
Tablo 15: Gruplara göre enflamasyon değerlendirmesi.....	61
Tablo 16: Gruplarda nükleer değişiklik sonuçları.....	62
Tablo 17: Gruplara göre nükleer değişiklik değerlendirmesi.....	63
Tablo 18: Gruplarda hyalinizasyon sonuçları.....	64
Tablo 19: Gruplara göre hyalinizasyon değerlendirmesi.....	64

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İskemi reperfüzyon hasarı rekonstrüktif cerrahide, replantasyon cerrahisinde ve reeksplorasyon yapılan vakalarda önemli bir problemdir (1). Komatsu ve Tamai'nin 1965'de total ampute başparmakta replantasyonu gerçekleştirmelerinden sonra reperfüzyon hasarı güncelleşmiştir. Baş-boyun, meme, alt ve üst ekstremitte rekonstrüksiyonunda uygulanan pediküllü kas-deri fleplerinde %25'e varan oranda kısmi flep nekrozu bildirilmiştir. Sonuç olarak bu komplikasyonlar sebebi ile hastanın geçireceği ameliyat sayısı, hastanede kalış süresi, maruz kaldığı ekonomik, fizyolojik ve psikolojik stres artmakta, ekstremitte kaybı ve ölüm gerçekleşebilmektedir (2,3).

Kas fleplerinde flep kaybı; enfeksiyon, arterioskleroz, hipotansiyon, malnütrisyon gibi sistemik; bası, gerginlik, anastomozda tromboz, pedikülde katlanma gibi lokal dış nedenlerle veya yetersiz besleyici akım gibi bir iç nedenle gerçekleşebilir (4,5,9,11,17). Hatalı flep dizaynı nedeniyle perfüzyonda yetersizlik ve kısmi flep nekrozu oluşabilir. Bölgede vasküler desteğin flebe dahil edilmesi ile yaşayan flep alanında artış sağlanabilmektedir (14). Cerrahi geciktirme işleminin, flep yaşam alanını, oluşturduğu hipoksiye yanıt olarak anastomotik bağlantıların açılması ile arttırdığı gösterilmekle birlikte iki ayrı operasyon gerektirmesi kullanımını sınırlamaktadır (21).

İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, differansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. İskemiye bazı dokular (kemik ve deri) dirençliyen bazıları (iskelet kası ve barsak mukozası) ise hassastır (6,7). İ-R; artmış oksidan oluşumu, kompleman aktivasyonu, lökosit-endotel-platelet adezyon ve etkileşimi, mikrovasküler geçirgenlik artışı, endotel bağımlı vazodilatasyon disfonksiyonu ve enflamatuvar molekül (sitokin, kemokin) artışı ile karakterizedir. İ-R hasarı sırasında lökosit, endotel, T lenfosit, monosit ve platelet aktivasyon ve hücreler arası etkileşimleri gerçekleşmekte olup, hasarın genişlemesinde lökosit-endotel ve lökosit-platelet etkileşimleri merkezi rol oynar (8). Reperfüzyon sonrası

iskemik doku lökosit göçü ve lökosit-endotel adezyonu; tümör nekroz faktör (TNF), interlökin (IL)-1, platelet aktive edici faktör (PAF), kompleman sistem ve serbest oksijen radikalleri (SOR) aracılığıyla gerçekleşir. Aktive olmuş lökositlerin endotele yapışıp intertisyel alana geçişleri; lökosit yuvarlanma, adezyon ve diapedezi süreçlerini içerir ve düzenli bir şekilde gerçekleşir (20).

Kasta iskemi ve reperfüzyon hasarını azaltmak için bir dizi kimyasal ilaçlar ve fiziksel yöntemler denenmiştir. Bunlar; serbest radikal temizleyiciler (süperoksit dismutaz, katalaz, allopürinol, deferoksamin..vb), trombolitik ajanlar (ürokinaz, doku plazminojen aktivatörü/TPA), PG-E1, heparin, vitamin C , antienflamatuar ajanlar, nitrik oksit (NO) donörleri, eritropoetin, hiperbarik oksijen, kalsiyum kanal blokerleri, aselüler fizyolojik yıkama solusyonları, immünsüpresifler (FK- 506, siklosporin, deksametazon), hormonlar (dehidroepiandrosteron, progesteron), nötrofil adezyon ve fonksiyon reseptörlerinin antikorları (CD11/18, ICAM-1, PECAM-1, E- selektin, P-selektin) ve büyüme faktörleri (FGF, PDGF, TGF, VEGF) olarak özetlenebilir (9-13,15,16,18). İskemi reperfüzyon hasarı nekrozla sonuçlanabilecek şiddetli bölgesel doku hasarı ve yüksek sistemik komplikasyon oranıyla ilişkili olarak günümüzde halen bir problem olarak karşımıza çıkmaktadır (19). Serbest radikal temizleyicilerinin sıçan ve insandaki enzim seviyelerinin farklı olması nedeniyle klinik kullanımları uygun değildir. Trombolitik ajanlar, PG-E1, heparin, aspirin ve steroid klinik çalışmalarda kullanılmıştır. Tüm bu yöntemlerle kas, kas-deri ve deri fleplerinde sağkalımı arttırmak amaçlanmaktadır (9-11,22).

Bununla birlikte anestezi ajanlarının bu hasarda koruyucu etkilerinin bilinmesi oldukça önem taşımaktadır (23-30). Kas dokusunda iskemi reperfüzyon hasarının operasyon sırasında kullanılan anestezi ajanlarla azaltılıp azaltılmayacağı konusu son yıllarda araştırmacıların ilgi odağı haline gelmiştir. İntravenöz anestezi propofol yapısı itibarıyla fenol bazlı serbest radikalleri ortamdan uzaklaştırıcı kimyasallara benzemektedir. Propofolun hasarı azaltacak olumlu etkileri araştırılmıştır (30-39).

Anestezi bölgesel kan akımı ve hemodinamiyi kontrol ederek flep cerrahisinde başarıyı arttıran önemli faktörlerden biri olabilmektedir (40,42). Bölgesel anestezi

yöntemlerden spinal ve epidural anestezi analjezik özelliğinin yanı sıra periferik vazodilatasyona bağlı kan akımında artışı sağlayarak oksidatif stresin neden olduğu serbest oksijen radikali oluşumunu önlediği ve iskemi ve reperfüzyon hasarında yararlı olduğu düşünülen anestezik yöntemlerdir (41,43-46). Bu çalışma sonunda iskemi reperfüzyon hasarını azaltmakta etkili olduğu düşünülen bu yöntemlerin etkinliği histopatolojik ve biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilerek tedavi seçeneği olarak uygunlukları ortaya konulacaktır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Kas Flepleri

Form ve fonksiyon oluşturmak amacı ile kanlanması orijinal yerinden ayrılmadan ya da aktarıldığı yerde devam edecek şekilde başka bir vücut bölgesine aktarılan doku parçasına flep denir (4,5).

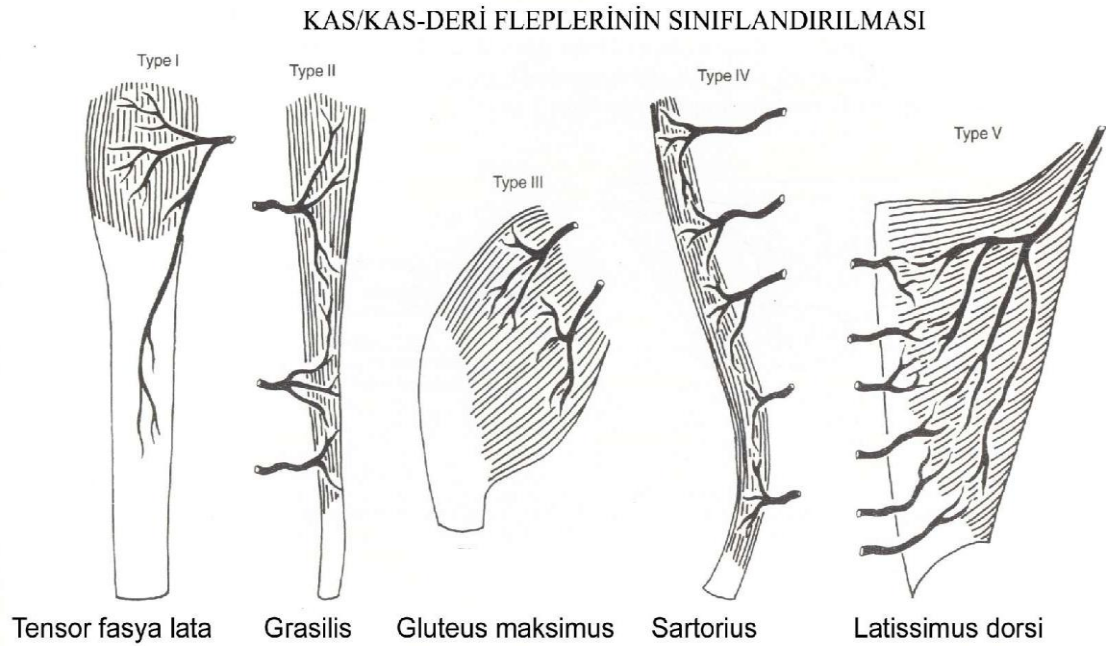
Flep tiplerinden biri olan kas ve kas-deri flepleri, plastik, rekonstrüktif ve estetik cerrahi pratiğinde sık kullanılan ve hacimsel doku kayıplarını kapamada üstün olan fleplerdir. Kas fleplerinin radikal mastektomi deformiteleri için lattisimus dorsi kas-deri flebini kullanan ve tarif eden Tanzini tarafından 1906 tarihinde keşfedilmiştir (9,11,50) . Morax 1908 yılında baş ve boyun rekonstrüksiyonu amacıyla tarif ettiği platizmal kas-deri flebini keşfetmiştir. Bakamjian ve Littlewood vaskülariteyi arttırmak için servikal deri fleplerine platizma kasını dahil ettiler (49,51). Hueston ve Mcconchie ile DesPrez ve arkadaşları pektoralis ve lattisimus dorsi kas deri flebini tarif ettiler. Mathes ve Nahai kasların vasküler anatomisi üzerinde çalışarak kas flepleri için günümüzde de kullanılan bir klasifikasyon tarif ettiler (50,52).

Kas fleplerinin bir çok avantajı vardır. Üzerlerine taşınabilir geniş boyutta deri sağlamalarının yanında kolayca şekil alabildikleri için düzensiz ve kompleks yaralarda kullanımı uygundur (9). Kas fleplerinin en önemli avantajı kasların geniş kaynaklı damarlardan beslenmesine bağlı olarak vaskülaritesinin cilt fleplerinden oldukça fazla ve güvenilir olmasıdır (10-12). Alıcı sahaya mükemmel derecede kanlanma sağladığı için kullanıldığı bölgede enfeksiyona direnci arttırırlar. Osteomyelit üzerinde yararlı etkilerini tarif eden bir çok çalışma bulunmaktadır. Ayrıca kas fleplerinin güvenli olarak kaldırılmasını ve tahmin edilebilir bir rotasyon arkını sağlayan sabit vasküler anatomileri vardır (16,17).

Kas flepleri kanlanma şekillerine göre beş tipte sınıflandırılır (Şekil 1).

- Tip I (Tek vasküler pedikül): Tek bir majör vasküler pedikülü vardır.

- Tip II (Dominant vasküler pedikül ve minör pediküller): Bu grupta flepler kaldırılırken, dominant pedikül korunur ve genellikle minör pediküllerin kesilmesi gerekmektedir. İnsanda en sık görülen dolaşım tipi budur.
- Tip III (Dominant pediküller): Kası besleyen iki adet büyük vasküler pedikül bulunmaktadır.
- Tip IV (Segmental vasküler pediküller): Genellikle eşit büyüklükte birkaç vasküler pedikül vardır. Her segmental pedikül kasın bir kısmını besler. Kısıtlı bir rotasyon arkları vardır.
- Tip V (Dominant vasküler pedikül ve sekonder segmental pediküller): Bu tip kasların, yeterli dolaşımı sağlayan büyük bir vasküler pedikülü ve kasa karşı taraftan giren sekonder segmental vasküler pedikülleri vardır. Tip V kaslar her iki pedikül üzerinde de transfer edilebilirler.

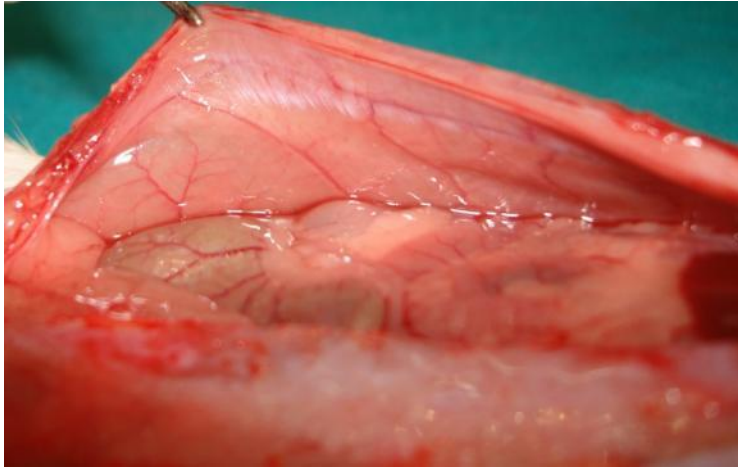


Şekil 1: Kas fleplerinin kanlanma şekillerine göre Mathes-Nahai sınıflaması

2.2. Rektus Abdominis Kas-Deri Flepleri

Sıçan rektus abdominis kas flebi insandaki karşılığı ile büyük benzerlikler gösterir. Karnın ön tarafında çift şerit şeklinde sternum-pubis arasında gerili duran ve

ana işlevi gövde fleksiyonu olan bu kas çifti insanda kolay hazırlanan ve değişik rekonstrüksiyon gereksinimlerinde başvurulacak önemli bir flep seçeneğidir. Rektus abdominis kası ve epigastrik arterlerin anatomisi 1960 yılında Milroy ve ark. Tarafından ayrıntılı bir çalışmayla ortaya konmuş ve sonraki yıllarda kullanılacak rektus abdominis kas ve kas-deri fleplerinin dayanağını oluşturmuştur (54-56). 1974 yılında Tai ve Hasegawa tarafından meme rekonstrüksiyonu için üst batından hazırlanan transvers deri flebi ve 1977 yılında ise önce Drever sonra da Mathes ve Botswick'in çalışmaları süperior epigastrik damarlardan beslenen rektus abdominis kas-deri fleplerinin yaygınlaşmasına öncülük etmiştir. Derin inferior epigastrik arter üzerinde hazırlanan rektus abdominis kas-deri flebini 1980 yılında serbest flep olarak kullanan Pennington ve Pelly'den sonra 1984 yılında Taylor ve ark.'nın yaptığı kadavra çalışması ise inferior epigastrik pediküllü fleplerin öncülüğünü yapmıştır (50,51,60-62,65,68).



Şekil 2: Rektus abdominis flebinde süperior ve inferior derin epigastrik arterler

Sıçanda rektus abdominis kas ve kas-deri flebi modelleri ise 1993 yılında iki bağımsız ekip tarafından tanımlanmıştır (Zhang ve ark.; Dunn ve ark.). Süperior ve inferior derin epigastrik damarlar yoluyla iki ucundan kan alan rektus abdominis kas flebinde daha güçlü damar insanda inferior derin epigastrikler iken, sıçanda süperior epigastriklerdir (Şekil 2). Ayrıca insandaki kas-deri perforatörleri sıçana kıyasla daha gelişmiş olduğu için daha farklı flep planlamaları mümkün olmaktadır. Bununla

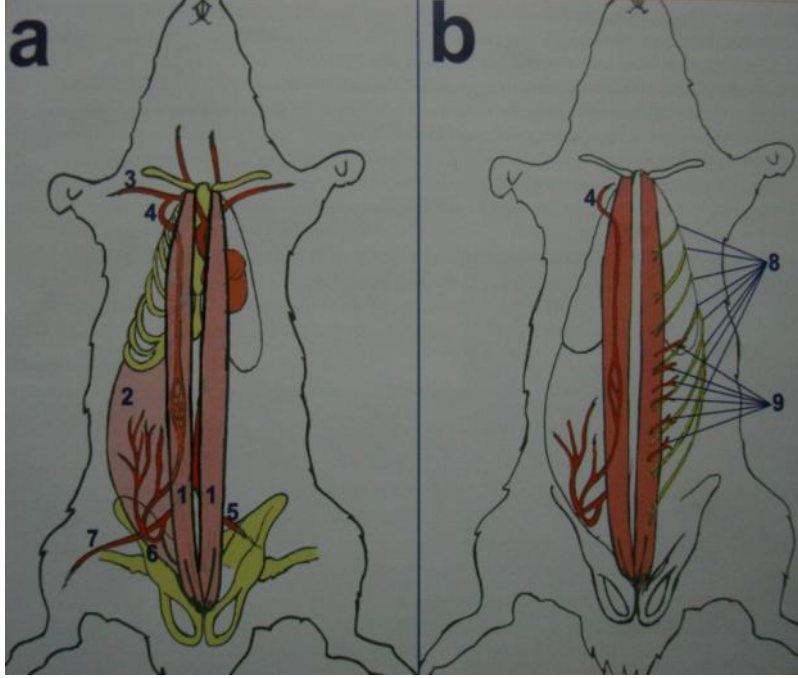
birlikte, sıçanda da rektus abdominis kası ile gerçek kas-deri flepleri hazırlanabilmektedir (67,68).

2.2.1. Anatomi

Karın ön duvarını oluşturan dört kastan dikey doğrultuda yerleşmiş olanı rektus abdominisdir. Klavikulaya kadar tüm sternal kaburga kıkırdaklarından başlayıp aşağıda simfisis pubise kadar şerit şeklinde uzanan bir çift kas olan rektus abdominis gövde fleksiyonunda görev alır. Yanlardan ortaya doğru yelpaze şeklinde değişik yönlerde dağılım gösteren diğer üç karın duvarı kası ise en dışta eksternal oblik, ortada internal oblik ve en içte ise transversus abdominis kaslarıdır. Karın içi basıncı arttırıp gövde fleksiyonuna katılan bu kaslar ortaya doğru aponevrotik yapılar haline dönüşerek rektus abdominis kasının alt ve üst yüzlerini saran fasya kılıflarını oluşturur. İnsandakine benzer biçimde yukardan ve aşağıdan kasa giren iki ana damar sistemi (yan yana ilerleyen arter ve ven) ortada birleşerek “flow-through” dolaşım kalıbı yaratırlar (Şekil 3).

İnsanda bu iki ana sistemden herhangi biri tek başına tüm kası besleyebilir. Ayrıca insanda aşağıdan kasa giren inferior epigastrik damarlar, yukardan giren süperior epigastriklere göre daha geniş çap ve debiye sahip oldukları için kas-deri flebi modelinde daha güçlü doku dolaşımı sağlar. Sıçanda ise insandakinin tersine süperior epigastrik sistem daha güvenilir ve geniş damarlara sahiptir (54,56,57). Ayrıca sıçandaki inferior epigastrikler insandaki gibi doğrudan eksternal ilyak damarlardan çıkmazlar. Bunun yerine pudik-epigastrik trunkustan ya da hipogastrik sistemden kaynaklanırlar ve anatomik varyasyonlar daha sıktır. Sıçanda inferior epigastrik damarlar karın duvarı kasları ve rektus abdominise dağılır. Ancak rektus kasına giden dal nispeten daha ince bir damardır (53,55). Inferior epigastrik damarların insandakinden farklı olarak karın duvarı kaslarına dağılması sayesinde sıçanda karın duvarı kaslarından flep hazırlamak mümkündür. Sıçanda insandaki gibi gerçek kas-deri flepleri hazırlamak deri anatomisi nedeniyle çoğu zaman mümkün olmaz (54,57,58-60). Evrim sonucunda insanda gerileyip yerini scarpa fasyası gibi aponevrotik yapılara bırakmış olan pannikulus karnosus kası karın ve sırt bölgesinde

deri altı planı kaplamakta ve üzerindeki deri bölgeleri baskın dolaşımı aksiyel damarlardan sağlamaktadır



Şekil 3: Rektus abdominis kas flebinin anatomisi. **a)** Rektus abdominis kaslarının yapışma yerleri ve damar anatomisi; **b)** Rektus abdominis kasının deri perforatörleri ve sinirleri. 1. Sağ ve sol rektus abdominis kasları; 2. Karın duvarı kasları (eksternal oblik, internal oblik ve transversus abdominis); 3. Sağ subklavyen-aksiller sistemi; 4. İnternal meme arteri ve devamında derin süperior epigastrik arter; 5. Ortak eksternal ilyak arter; 6. Eksternal ilyak arterin dalı olan pudik-epigastrik trunkustan çıkan inferior epigastrik arter; 7. Femoral arter; 8. Rektus abdominis kasının segmenter innervasyonunu sağlayan 5-13 arası interkostal sinirler; 9. Rektus abdominis kasından üzerindeki deriye ortalama 6-10 arası perforatör gider (Özgentaş ve ark.,1994).

Buna karşılık karın duvarı kaslarından gelen kas-deri perforatörleri güvenilir deri dolaşımı sağlayamamaktadır. İnsanda pannikulus karnosus kasının gerilemesi, bununla ilişkili olduğu varsayılan aksiyel damarların önemsizleşip kas-deri perforatörlerinin gelişmesi sürecine yol açmıştır. Pannikulus karnosus kası karnın her iki yanında uzanmakta ve orta hatta yakın bir fasya tabakasına dönüşmektedir. Sıçan rektus abdominis kası ise bu bölgede deriye nispeten güvenilir 6-7 adet perforatör damar göndermekte ve gerçek kas-deri flebi şeklinde bir model mümkün olmaktadır. Kas-deri flebinde deri adasını kas eksenine paralel olarak yerleştirilip birden fazla perforandan yararlanmak güvenlidir (52-55,59,65-68).

Rektus abdominis bir cm eninde nispeten büyük bir kas flebi modelidir. İnce uzun yapısıyla yaklaşık üç gr ağırlığında, 4x1 cm boyutlarında bir flep hazırlanabilir. Sıçanda rektus abdominis kas ya da kas-deri flebinin mikrocerrahi aktarımında anastomoz için kullanılan derin süperior epigastrik damarlar 0.3-0.5 mm çapındadır. Bir araştırma protokolünde böyle bir serbest flep modelin kullanılması en deneyimli ellerde bile yüksek oranda başarısızlığı göze almakla mümkündür. Bu nedenle modelin mikrocerrahi aktarımından kaçınarak ada flebi olarak kullanılması araştırma protokolleri için daha güvenlidir (64-64). Rektus abdominis kasları sinir uyarısını yine insandakine benzer biçimde segmenter olarak 5.ve 13.'ye kadar olan interkostal sinirlerden alırlar. Bu sinirler disseksiyon sırasında fark edilseler bile mikrocerrahi işlemler için güvenilir büyüklükte değildir ve flebin işlevsel aktarımına ilişkin bilgi de yoktur (55,59,65,67,68).

2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

2.3.1. İskemi

İskemi, dokunun oksijen ve diğer metabolitlere olan gereksiniminin perfüzyon bozukluğuna bağlı dolaşım tarafından sağlanamaması ve bu süreçte oluşan atık ürünlerin yine dolaşım tarafından uzaklaştırılamaması olarak tanımlanır. Hipoksi ise dokuya yetersiz oksijen sunumu şeklinde tarif edilebilir. Hipoksinin en sık görülen nedeni iskemidir. Her iki durum da İ-R hasarının ilk kısmını oluşturmakta ve metabolizmanın anaerobik yöne kaymasıyla karakterizedir (1,2,22,69,71). Ancak iskemide, hem metabolit yetersizliği hem de atık ürün birikimi nedeniyle, glikoliz metabolizması hipoksiye oranla daha erken sonlanır ve hasar çok daha erken oluşur. Oksijen hemostazı insan fizyolojisinde hayati önem taşır. Oksidatif fosforilasyon sırasında ATP sentezi için kullanılan oksijen aynı zamanda hücrel lipid, nükleik asit ve proteinlerdeki oksidatif hasar mekanizmalarında da rol oynar. Dolayısıyla, protein sentezi ve aktivitesini kontrol eden kısa ve uzun dönem mekanizmalarla hücrel ve sistemik oksijen konsantrasyonlarının dengelenmesi oksijen biyoyararlanımı açısından önemlidir (72-75,78).

İskemi, akut veya kronik olabilir. Soğuk iskemi ile vücut dışında oluşan doku iskemisi kastedilir. Sıcak iskemi ise vücut içindeki doku iskemisidir. Dokuların sıcak ve soğuk iskemiye olan yanıtları farklı olup, sıcak iskemide en çok hepatositler, soğuk iskemide ise en çok endotel ve kupffer hücreler etkilenir. İskemiye bağlı hasarın şiddeti, hipoperfüzyonun süresi ve miktarı ile orantılı olup, hücrenin tipi, yaralanmaya karşı hassasiyeti, diferansiyasyonu, kan ihtiyacı ve metabolizmasına göre farklılık gösterir. Sonuç olarak, hücresel enerji depolarındaki azalma ve toksik metabolit birikimi hücre ölümüne yol açar. Hipoksik dokunun çeşitli moleküler mekanizmalarla yetersiz oksijenizasyona fizyolojik reaksiyonlar oluşturabilmesi, vasküler endotel büyüme faktörü (VEGF) sentezini kontrol edebilmesiyle oluşur. VEGF, anjiyogeneizde önemli rol oynar. Hipokside, yeterli doku perfüzyonu sağlanabilmesi için, hem VEGF sentezi (transkripsiyonel mekanizma) artar hem de VEGF yıkımı (mRNA stabilizasyonu) azalarak doku VEGF mRNA düzeyi artar. Hipoksik doku hasarında diğer tüm protein sentezleri azalırken, VEGF mRNA translokasyonu devam etmektedir .VEGF mRNA transkripsiyonu, HIF-1'in insan VEGF geni 5I-transkripsiyonel bölümüyle etkileşime girmesi sonucu aktive olur. HIF-1, basit bir heliks-halka-heliks per-ARNT-sim (PAS) protein olup, alt ünitelerinden oluşur. Hipoksi durumunda, HIF-1 protein seviyesi hızlı şekilde artarken, doku iskemisi ortadan kaldırıldığında, hücreler tarafından sentezi baskılanır. Dolayısıyla hipokside, hücre çekirdeği HIF-1 proteinini birikerek dimerleşir ve çekirdek deoksiribonükleik asit (DNA) 5ICGTG-3I sırasına bağlanarak VEGF transkripsiyonunu aktive eder (70,76-78).

Sonuç olarak, uzun süreli doku iskemisinde; hücresel şişme, asidoz, iyon dağılım değişiklikleri (hücre içi kalsiyum/sodyum oranında artış), hipoksantin seviyesi artışı, adenosin trifosfat (ATP) / fosfokreatin ve glutation düzeyi azalması, adenosin sinyal aktivitesi artışı, membran potansiyel değişiklikleri, iskelet bütünlüğü kaybı, nükleotid fosfohidrolizi (CD39 ve CD73 yoluyla) ve hipoksi indükleyici faktör (HIF-1) çekirdek translokasyonu ile stabilizasyonu gibi hücre metabolizması ve iskelet yapısını ilgilendiren birçok değişim meydana gelir.

2.3.2. Reperfüzyon

İskemiye bağlı hasarın geri döndürülebilmesinde doku reperfüzyonu mutlak olmakla birlikte paradoksik olarak, reperfüzyon sonrası sağlanan oksijen ve metabolitler doku hasarının artışına neden olur. Birçok çalışmada, İ-R hasarının iskemik hasara göre çok daha fazla toksik ürün oluşturduğu gözlenmiştir (18,20,79). Reperfüzyon sırasında oluşan reaktif oksijen türevlerinin endotel üzerindeki hasarlayıcı etkisi, endotel kaynaklı endotelin sentezinde artış ve NO sentezinde azalma gibi faktörler ciddi endotel disfonksiyonuna neden olur. Klinikte bu durum tromboliz, embolektomi, by-pass cerrahisi, organ transplantasyonu, turnike uygulamaları, replantasyon, mikrovasküler serbest doku aktarımı gibi durumlarda görülür.

İskemik dönemde oluşan oksidatif fosforilasyon hasarı, hem ATP depolarında hızlı tükenme ve hipoksantin artışına, hem de azalmış ATP'ye bağlı hücre içi kalsiyumda hızlı artışa neden olur. Dolayısıyla, hücre içi kalsiyumun artış hızı ve miktarı, hasarı etkileyen en önemli ve erken mekanizma olup, hücre nekroz ve apoptozis ile direkt ilişkilidir. Artmış mitokondriyal kalsiyum, oksijenin suya olan dördüncü seviyeden redüksiyonunu engelleyerek birinci derece redüksiyon ve radikal oluşumuna neden olur. Ek olarak, iskemik dokuda ATP'yi daha fazla azaltıp hasarı derinleştirir. Kalsiyum hücre içi birikimi reperfüzyon süresince artarak devam eder. Dolayısıyla doku iskemisi sonucu gelişen hücre içi kalsiyum artışı ve ATP azalması birbirlerini indükleyerek kısır bir döngüye neden olur. Hücre içi kalsiyum birikiminin engellenmesi bu kısır döngüyü kırarak kalsiyuma bağlı oluşan hasarları azaltır (80-82). Artmış hücre içi kalsiyum, bir proteaz enzim olan kalpain aktivasyonunu ve dolayısıyla ksantin dehidrogenaz (KD) enziminin ksantin oksido-redüktaz (KO) enzim formuna dönüşümünü sağlar. Sağlıklı kişide her iki enzim formu da aktif halde bulunur ancak KD hakimiyeti mevcut olup hipoksantini sırasıyla ksantin ve ürik aside çevirir. KD bu fonksiyonu sırasında elektron taşıyıcı bir molekül olan nikotinamide adenin dinükleotid kullanır ve oksijene ihtiyaç duymaz. Doku iskemisi sırasında ise, enzimin KO formu baskın hale gelir ancak KO aktivitesi oksijen gerektirdiği için iskemik dokuda KO birikimi olur. Dolayısıyla, iskemik dönemde,

hipoksiye bağlı hipoksantin ve KO birikimi söz konusudur. Reperfüzyon döneminde ise, oksijen sunumuyla birlikte KO aktivasyonu ve hipoksantinden toksik oksijen radikalleri oluşur. KO enzim seviyesi ve aktivitesi, türden türe ve dokudan dokuya farklılık gösterir. Endotel hücreleri, vücutta diğer dokulara oranla daha fazla KO enzim aktivitesine sahip olup, İ-R hasarına en hassas dokulardır. Reperfüzyon hasarında, reaktif oksijen türevlerinin ilk oluştuğu bölge endotel-kan sınırır ve KO'a bağlı endotel hasarı İ-R hasarının en önemli faktörlerindendir (83,84,87).

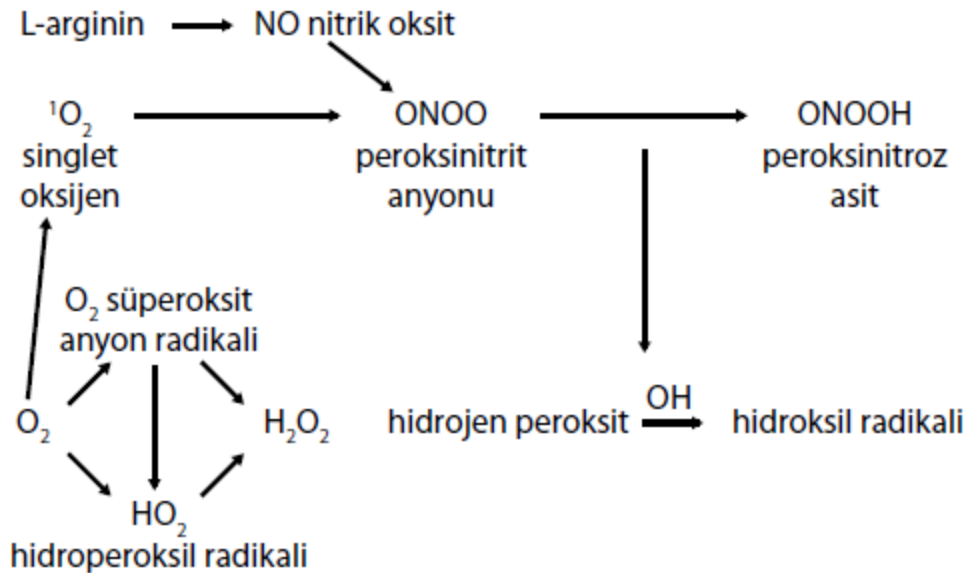
Doku oksijenasyonu yeniden sağlandığında, oksijen, KO ve hipoksantin'in birbirleriyle olan etkileşimi; ürik asit, süperoksit ve H₂O oluşumuyla sonuçlanır. Dolayısıyla, reperfüzyonun ilk 10-30 saniyesinde, reaktif oksijen radikali patlaması yaşanır. Oluşan süperoksit, çok zararlı bir molekül olmayıp, hidrojen peroksit (H₂O₂) için kaynak oluşturur. Süperoksitin hidrojen peroksite dönüşümü SOD enzimi aracılığıyla gerçekleşir. Katalaz enzimi ise oluşan hidrojen peroksiti, su ve oksijene çevirir. Hidrojen peroksit'in geçiş metalleriyle (en sıklıkla serbest demir) reaksiyona girmesi sonucunda hidroksil (OH⁻) radikali oluşur. Hidrojen peroksitte süperoksit gibi çok zararlı bir molekül olmayıp, en önemli fonksiyonu hidroksil radikali için bir kaynak olmasıdır. Dolayısıyla, süperoksit ve hidrojen peroksit radikallerine bağlı lipid peroksidasyonu ancak bu moleküllerin serbest demir ile reaksiyona girip hidroksil radikali oluşturmalarıyla belirgin hale gelir. Hidroksil radikali güçlü bir oksidan molekül olup, SOD ve katalaz enzimleri bu molekülün temizlenmesinde doğal savunma mekanizmalarını oluştururlar. Buna ek olarak, sağlıklı kişilerde demir; kanda hemoglobin, kasta myoglobin, dolaşımda transferrin ve hücrelerde ferritin şekillerinde depolanarak serbest şekilde bulunmaz. Doku iskemisi sonucu oluşan hücresel asidoz, artmış redüktan madde seviyesi ve SOD aktivitesi, ferritine bağlı hücresel demirin serbestlenmesine neden olur. Aynı zamanda artmış hemoliz ve hidrojen peroksit aktivitesi de hemoglobine bağlı demiri açığa çıkartır (85,86,88-90).

1934 yılında, süperoksit ve hidrojen peroksit etkileşimi sonrası hidroksil radikali oluşumu tanımlanmıştır. Haber-Weiss reaksiyonu olarak adlandırılan sistem ($O_2^- + H_2O_2 \rightarrow OH\cdot + O_2 + OH^-$) bir metal katalizör olmaksızın fonksiyon görmez. Bu nedenle demirle katalize edilmiş Haber-Weiss reaksiyonu (Fenton reaksiyonu)

tanımlanmıştır ($\text{Fe}^{+2} + \text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow \text{OH}^- + \text{OH}^- + \text{Fe}^{+3}$). Demir vücutta en çok Fe^{+3} (ferrik demir) formda bulunur ancak hidroksil radikal oluşumu için Fe^{+2} (ferröz demir) formu gerekir. Ferrik formun ferröz forma dönüşümünde KO, süperoksit radikali ve NO rol oynar. Dolayısıyla, süperoksit toksisitesinde bağlı demiri serbestleyebilmesi ve ferrik formu ferröz forma çevirebilmesi önemli rol oynar (92,93). SOR'un diğer kaynakları; aktive olmuş polimorfonükleer lökosit (PNL), mitokondri nikotinamidadenindinükleotidfosfat (NADPH) dehidrogenaz sistemi, katekolaminlerin otooksidasyonu ve araşidonik asit metabolizmasıdır. Hidroksil radikali, vücutta hemen hemen tüm moleküllerle reaksiyona girebilen, bilinen en güçlü ve zararlı oksitleyici ajanlardan biridir. Bu serbest radikaller, özellikle de hidroksil radikali, hücre zarı lipid peroksidasyonunu başlatıp, araşidonik asit ve lipid peroksil serbest radikallerin salınımına neden olur. Araşidonik asit, siklooksijenaz [Thromboksan A2 (TxA2), PGE1, PGI2)] veya lipooksijenaz (LT-B4, LT-C4, LT-D4, LT-E4) enzimleriyle metabolize olup eikosanoidlere dönüşürken, lipid peroksil radikali; lipid peroksidasyonuna devam eder. Bu olaylar sonucunda, hücre zarı seçici geçirgenlik kaybı, DNA hasarı, yapısal proteinlerin yıkımı, hücre zarı etkileşimli enzimlerin inaktivasyonu ve sitoliz görülür. Hidroksil radikali başka bir radikal ile birleşip inaktive oluncaya veya tükeninceye dek bu zincirleme reaksiyon devam eder. Deneysel olarak; SOR'u uzaklaştıran sistemler (SOD, desferoxamine, dimethylthiourea), lipid peroksidasyon inhibitörleri (21-aminosteroidler) ve TxA2 / LT-B4 reseptör antagonistlerinin, reperfüzyon hasarına etkileri çeşitli modellerde çalışılmıştır. ROT'un, lipid peroksidasyonuna bağlı oluşturduğu hasarlar; artmış hücre zarı geçirgenliği, endoplazmik retikulum hasarına bağlı negatif inotropi, bozulmuş hücre fonksiyon ve hücre ölümüdür (91,94,95).

Endotel hücresi, hem NO hemde endotelin sentezler. Arteriyal yatakta NO (vazodilatasyon) ve endotelin (vazokonstriksiyon) zıt etkiye bulunurlarken, venöz yatakta her ikisi de vazokonstriksiyon sağlar. İskemik dönemde, bilinen en potent vazokonstriktör ajan olan endotelin sentezi artar. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) yoluyla sentezlenir ve bu enzimin birçok izoformu [indükleyici NOS (iNOS), endotelial NOS (eNOS), nöral NOS (nNOS)] vardır. NO sentezinde arjinin ve moleküler oksijen gerekir. İçinde bulunduğu şartlara bağlı olarak hem toksik hem de

yararlı olabilmektedir. Sağlıklı kişilerde düşük doz NO ile siklik guanozin monofosfat (cGMP) aracılı vazodilatasyon, platelet agregasyon ve lökosit adezyonunda azalma, ROT nötralizasyonu ve apoptozisde azalma görülür. Ancak artmış iNOS aktivitesine bağlı oluşan yüksek NO konsantrasyonlarında, medikal tedaviye cevap vermeyen ve şiddetli vazodilatasyon ile karakterize sitotoksite yapar. Aynı zamanda, süperoksit ile etkileşime girerek, protein, lipid ve DNA gibi yapılarda toksik reaksiyonlar oluşturabilen peroksinitrit (ONOO^-) oluşumunu sağlar. Hipoksi sırasında iNOS aktivitesi artmakla birlikte, NO sentezinde oksijen de gerekli olduğundan, NO seviyesi artmaz. Reperfüzyon döneminde, oksijen sunumuyla birlikte, NO seviyesinde ani artış yaşanır. Bu dönemde, artmış süperoksit ve NO etkileşimi, NO seviyesinde azalmaya neden olur. Endotel hücre NO biyoyararlanımının arttırılmasının, İ-R'a bağlı hemodinamik problemler ve karaciğer hasarını azalttığı gösterilmiştir. NO'nun İ-R'daki koruyucu etkisi, endotel ve makrofajlarda sentezlenen endotelinin etkisini dengeleyebilmesine bağlı olabilir (96,98). Artmış NO biyoyararlanımı, aynı zamanda iltihabi sistemlerin (adezyon molekülleri, sitokinler) aktivasyonunu da azaltır. iNOS aktivitesinin engellenmesi ile de İ-R'a bağlı hasar azaltılabilmektedir (Şekil 4).



Şekil 4: Oksijen paradoksu; moleküler oksijenden serbest radikal oluşumu ve nitrik oksitle ilişkisi

PNL ve endotel hücrelerinin aktivasyon ve birbirleriyle olan etkileşimleri reperfüzyon hasarı patofizyolojisinde önemli rol oynar. Dolaşımdaki PNL'in, LT-B4, C5a ve sitokinler ile aktive olması sonucu PNL yüzey adezyon molekülü ifadesi artar. Lökositler, diapedez öncesi endotel yüzeyi adezyon molekülleri ile etkileşime girerek, güçlü endotel-lökosit adezyonu oluştururlar. Sonrasında, PNL'den NADPH bağımlı oksidaz sistemleri ile serbest kalan oksijen radikalleri ve proteaz enzimler doku hasarını artırır. Aktif hale gelmiş nötrofiller, İ-R hasarının en önemli SOR kaynaklarındandır. Nötrofil hareketleri ve marjinasyonu mikrovasküler endotel tarafından kontrol edilir. Normal fizyolojik şartlarda endotel hücrelerinin PNL'ye olan ilgisi düşüktür ancak direkt veya indirekt (histamin, trombin, sitokinler yoluyla) hasarlayıcı etkiyle, endotelden iltihabi aracı maddeler (LT-B4, TxA2, PAF ,IL-8) salınımı ve endotel yüzeyinde adezyon molekülü (P selektin, E selektin) ifadesi artar. Oluşan adezyon moleküllerinin monoklonal antikorlarla blokajı ile reperfüzyon hasarında azalma sağlanmıştır (97,99-101).

Reperfüzyona bağlı hücre hasarının karakteristik özellikleri, hücrel geçirgenlik artışı ve şişme ile hücre iskelet değişiklikleri olup bu durum doku ödemi ve kapiller kan akımı azalmasıyla sonuçlanır.

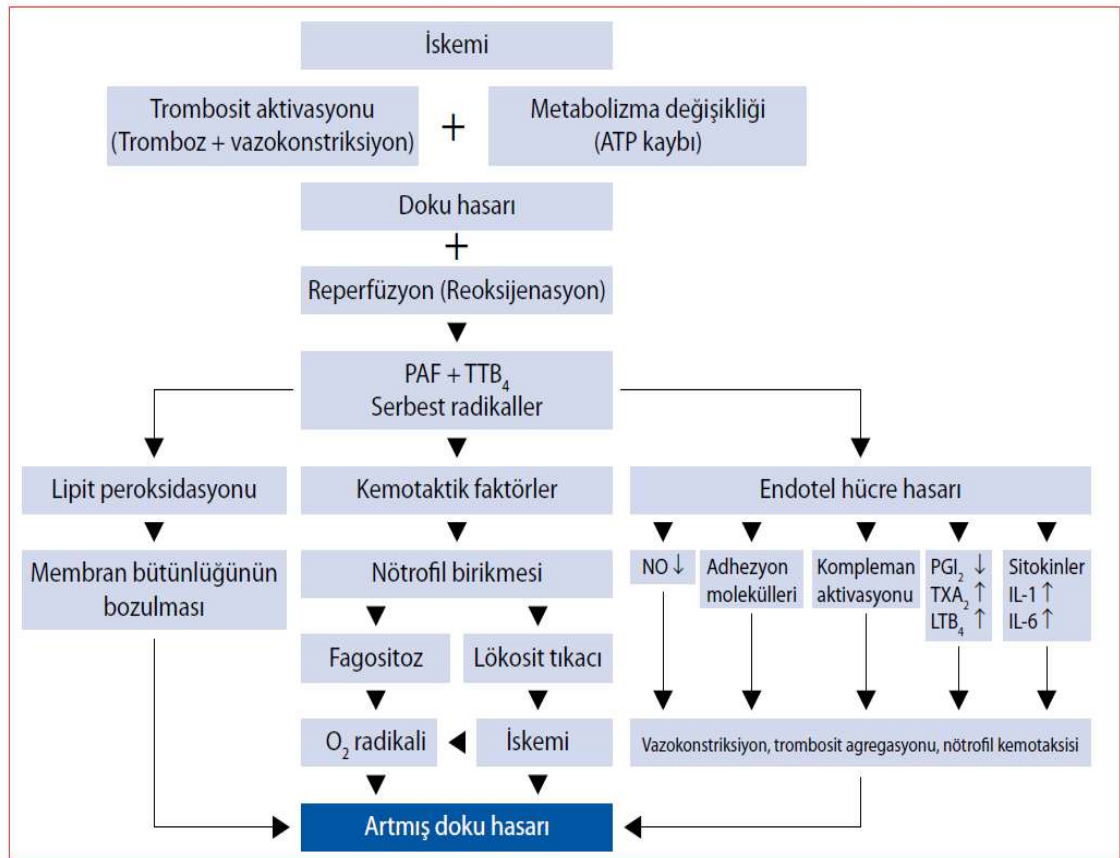
2.3.3. İskemi reperfüzyon hasar mekanizmaları

İskeminin hücrel hasarı insanlarda, deney hayvanlarında, hücre kültür sistemlerinde çok yaygın olarak çalışılmıştır. İskemiye tolerans hücre tipine ve yaşına bağlıdır. İskemi-reperfüzyon (İ/R) hasarının fizyopatolojisi ile ilgili çeşitli faktörler ileri sürülmüştür. Bunların birbiriyle ilişkileri karmaşık, hücrel ve humoral olaylar serisidir. Özellikle; serbest oksijen radikalleri, Polimorf nüveli lökositler (PNL), kompleman sistemi endotel hücreleri olmak üzere başlıca dört faktör hasarın nedenleri arasında yer almaktadır.

2.3.3.1. Serbest oksijen radikalleri

Serbest radikal, eşlenmemiş elektron içeren atom veya moleküldür. Genelde elektronlar atom veya molekülde eşlenik olarak bulunmaları nedeniyle molekül stabildir ve reaktif değildir. Ancak, moleküle bir elektron ilavesi ya da bir elektron kaybı onu reaktif hale getirir. Organizma sürekli olarak serbest radikal ataklarıyla karşı karşıyadır. Serbest radikaller fizyolojik şartlarda ve dış etkenlere karşı organizmanın savunmasında da belirli oranda oluşur ve içsel mekanizmalarla organizmaya olabilecek zararlı etkileri önlenir (102,104,107).

Süperoksit radikali, oksijen molekülüne bir elektron ilavesi ile oluşur ve serbest radikal hasarına karşı koruyucu antioksidan bir enzim olan ve oksidan hasar oluşumu ile birlikte artan süperoksit dismutaz (SOD) aracılığı ile hidrojen peroksit (H_2O_2)'e indirgenir. Hidrojen peroksit eşlenmemiş elektron içermediği için tek başına radikal değildir. Hidroksil radikali oldukça reaktif ve toksik bir radikaldir.



Şekil 5: İ/R hasarında yer alan olaylar dizisi

Hidroksil radikali büyük molekül yapısı ve elektronegativitesi nedeni ile DNA, protein, karbonhidrat ve lipitler gibi makromoleküllerle reaksiyona girerek bu yapılarda oksidatif hasara neden olur. Hücre zarı fosfolipidleri (araşidonik asit, linoleik asit ve linolenik asit gibi çoklu doymamış yağ asitleri), İ-R hasarı sırasında peroksidasyona uğrarlar ve bu süreç kısır döngü şeklinde devam eder. Lipid peroksidasyonu sonucu oluşan malondialdehid gibi stabil ürünlerin ölçümü, serbest oksijen radikali öncülerinin aktiviteleri konusunda fikir verir (103,105-106,119,120). Dolayısıyla lipid peroksidasyonu, İ-R hasarının hem tanısında hem de patofizyolojisinde önemli rol oynar (Tablo 1).

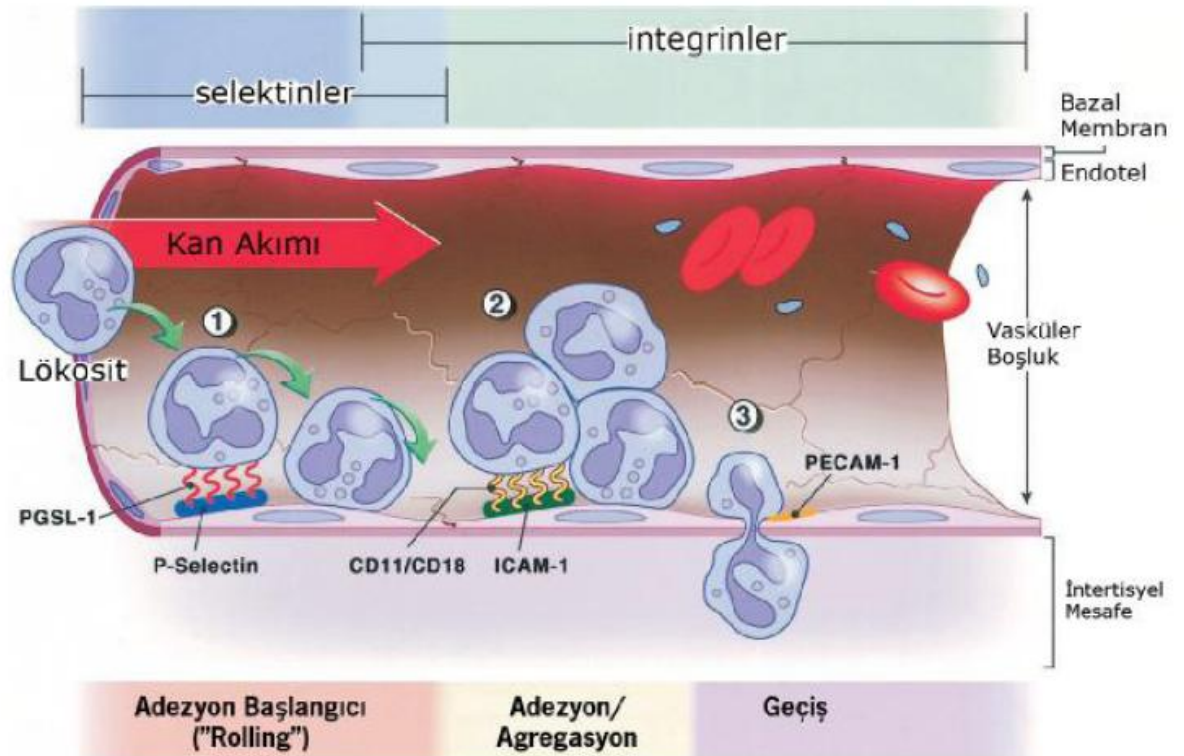
Tablo 1: Serbest oksijen radikalleri ve kimyasal gösterimleri

Süperoksit radikali	$O_2^{\cdot -}$
Perhidroksi radikali	$HO_2^{\cdot}$
Hidroksil radikali	$OH^{\cdot}$
Peroksil radikali	$ROO^{\cdot}$
Alkoksil radikali	$RO^{\cdot}$
Singlet oksijen	O_2^1
Nitrik oksit	NO
Peroksinitrit	$ONOO^{\cdot}$
Hidrojen peroksit	H_2O_2
Organik hidroksiperoxi	$ROOH$

2.3.3.2. Polimorf nüveli lökositler

Reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik antinötrofil serumlarla ya da lökosit adhezyon moleküllerine karşı monoklonal antikorlarla yapılan çalışmalar, reperfüzyonda mikrovasküler permeabilededeki artıştan başlıca nötrofillerin sorumlu olduğunu göstermiştir. İ/R ile lökosit aktivasyonu, kemotaksis ve lökosit endotel hücre adhezyonu meydana gelir. Diğer taraftan, PNL yüksek miktarda SOR üretme kapasitesine de sahiptir. İskemi reperfüzyon hasarında PNL'in rolü ile ilgili bazı

mekanizmalar ileri sürülmüştür. Bunlar; mikrovasküler oklüzyon, SOR salınması, sitotoksik enzim salınması, vasküler permeabilite artışı ve sitokin salınmasında artıştır. PNL'lerin aktivasyon ve migrasyonları endotel hücrelerinde ve lökositlerde bulunan adhezyon molekülleri aracılığıyla olur. Selektinler olarak bilinen adhezyon moleküllerinin L, P ve E selektin olmak üzere bilinen üç üyesi vardır. İ/R, endoteldeki P-selektin ekspresyonunu artırır (108,109). Bu molekül, PNL'lerde bulunan P-selektin glikoprotein1 (PSGL-1) adlı reseptörü ile etkileşerek düşük afiniteli lökosit endotel bağlantısını oluşturur (lökosit rolling). İkinci aşamada, lökosit beta2 integrinler (CD11a/CD18 ve CD11b/CD18) ile endoteldeki interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1) arasındaki etkileşim sonucunda lökosit adhezyonu ve agregasyonu gelişir (112). Üçüncü aşama ile, trombosit-endotel hücresi adhezyon molekülü 1 (PECAM-1) ile endotel hücre bağlantıları arasındaki etkileşim ile lökosit transmigrasyonu gerçekleşir. Aktive lökositler damar dışına ulaştınca hasar bölgesine doğru göç etmeye başlarlar (kemotaksis) (Şekil 6).



Şekil 6: Lökosit- endotel etkileşiminde lökosit adhezyon molekülleri ve lökosit göçünün şematize edilmesi (PSGL-1: P-selektin glikoprotein 1; CD11b/ CD18: Lökosit fonksiyon antijeni 1; ICAM-1: Endotelial hücre içi adhezyon molekülü-1; PECAM: Trombosit-endotel adhezyon molekülü-1)

Nötrofillerin dokuya gelebilmeleri için gerekli kemotaktik maddeler arasında C3a ve interlökin-1 (IL-1), lökotrien B4 (LT-B4), trombosit aktive edici faktör (PAF) ve prostaglandin (PG) türleri vardır. Aktif lökositler nükleer transkripsiyon faktörlerinin (NF-kB) aktivasyonuna ve tümör nekrozis faktör (TNF-alfa) sentezine yol açar. Lökositlerin ürettiği serbest radikallerle etkileşen bu maddeler, mast hücrelerinden selektin ve ICAM gibi adhezyon moleküllerini mobilize eden enflamatuvar mediyatörlerin salınmasını uyarırlar. Aktif nötrofiller salıverdikleri maddelerle yol açtıkları hasarın yanı sıra, damar içinde oluşturdıkları hücre toplulukları (agregatlar) ve aktif trombositlerle birlikte damar endoteline yapışarak mikrovasküler tıkanmaya da neden olurlar. Yapılan son çalışmalarda; nötrofillerin aktivasyon ve dokuya infiltrasyon derecesi ile reperfüze dokudaki nekroz ve apoptozis derecesi arasında bir korelasyon olduğu bulunmuştur. Dokuda aktive lökositlerin başlattığı yanıt şu mekanizmalar ile gerçekleştirilir; Fosfolipaz A2 aktivasyonu araşidonik asit metabolitleri (prostaglandinler ve lökotrienler) sonucu üretilir, degranülasyon sonucu lizozomal enzimler salınır ve SOR üretimi gerçekleşir (110,112).

Bu ürünler endotel hasarı ve doku zedelenmesinin güçlü araçlarıdır ve başlangıçtaki enflamatuvar uyarının etkisini güçlendirirler. Bazı durumlarda lizozomal enzimler hücre dışına salınabilir. Hasar yapıcı etkeni ortadan kaldırmaya veya yoğunluğunu azaltmaya yönelik bu enflamatuvar yanıt sonucu, mikrovasküler permeabilite artışı, ödem, tromboz ve parankim hücre ölümü de gerçekleşir. Görevini tamamlayan lökositler apoptotik hücre ölümüne uğrarlar ve makrofajlar aracılığıyla lenfatik dolaşım yoluyla ortamdan uzaklaştırılırlar.

İskemik dokunun reperfüzyonu, arteriyollerde endotel bağımlı dilatasyonun bozulmasına, kapillerlerde lökosit tıkaçlarının oluşmasına ve sıvı filtrasyonunun artmasına, post-kapiller venüllerde plazma proteinlerinin damar dışına sızmasına ve böylece mikrovasküler fonksiyonun bozulmasına neden olur. Reperfüzyonun başlangıç döneminde, mikrosirkülasyonun tüm segmentlerinde aktive edilmiş endotel hücrelerinden fazla miktarda O₂ oluşurken NO oluşumu ise azalır. Süperoksit radikali ile NO arasındaki dengenin bozulması, endotel hücrelerinden PAF, TNF-alfa gibi

enflamatuvar mediyatörlerin salınmasına ve lökosit-endotel hücre adhezyonuna aracılık eden adhezyon moleküllerinin biyosentezinin artmasına neden olur.

Serbest radikallerin oluşumunda ve İ/R hasarında önemli bir kaynak olan nötrofiller azurofilik granüllerinde oksidan etkili NADPH oksidaz, elastaz ve miyeloperoksidaz ezimlerini içerirler. Bu enzimler oksidan doku hasarında önemli roller üstlenir; aktive nötrofillerde ksantin-oksidad'ın artması ile SOR'un salınması "solunum patlaması" olayını meydana getirir. İskemi sonrası reperfüzyonun başlaması ile birlikte, dokuya sunulan oksijenin yaklaşık %70'i NADPH-bağımlı oksidaz ile süperoksit iyonlarına oksitlenmektedir. Süperoksit iyonu, çoğu kez spontan dismutasyonla hidrojen peroksite dönüşür. Hidrojen peroksit ise klorür iyonlarının varlığında myeloperoksidaz enzimi aracılığı ile hipoklorik aside indirgenir. Hipoklorik asit güçlü bir oksidandır ve birçok biyolojik moleküle kolayca reaksiyona girebilir. Nötrofillerin aktivasyonu ile nötrofil sekonder granüllerden salıverilen apolaktoferrin, plazminojen aktivatörü, komplemanı aktive eden enzim ve elastaz, kolajenaz, ve jelatinaz gibi proteolitik enzimler damar endotelinde hasara neden olmaktadır. Proteinazların etkisi ile damar duvarında yapının değişimi ve duvar yapısının gevşemesi ile nötrofillerin dokuya göçü kolaylaşır.

2.3.3.3. Komplemanın rolü

İskemi reperfüzyon hasarında kompleman sisteminin rolü tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. Kompleman sisteminin aktivasyonu sonunda proenflamatuvar komponentler oluşur. Bunlar C3a, C5a, iC3b ve C5b-9'dur. C3a ve C5a anaflatoksinlerdir ve lökositleri aktive ederler. Lökosit aktivasyonu ve kemotaksisin uyarılmasına ek olarak C5a, makrofaj enflamatuvar protein (MIP)-2, MIP-1a, MIP-1b, monosit kemoatraktan protein (MCP)-1, TNF-alfa, IL-1 ve IL-6 üretimini uyarak enflamatuvar yanıtı amplifiye eder. Kompleman tarafından sentezi uyarılan lökosit adhezyon molekülleri vasküler hücre adhezyon molekülü 1 (VCAM-1), interselüler adhezyon molekülü 1 (ICAM-1), E-selektin ve P-selektindir. C5b9 endotelde IL-1a, IL-8 ve MCP-1 salgısını uyarak lökosit aktivasyonu ve

kemotaksisi arttırır (113-115). Aynı zamanda endotel bağımlı vazodilatasyonu inhibe ederek ve endotelde siklik guanozin monofosfatı azaltarak vasküler tonusu bozar.

2.3.3.4. Endotel hücresinin rolü

İ/R hasarının oluşmasında endotel hücreleri önemli role sahiptir. Oksidatif stres endotel hücrelerinin aktivasyonuna ve işlevlerinin bozulmasına neden olur. Endotel hücreleri SOR için potansiyel hedef konumundayken diğer taraftan da SOR üretim kaynağıdır. Endotel, mikrovasküler hemostazdan sorumlu olan endotelin (ET)'i ve NO'yu üretir. NO arteriyel dolaşımda ET'in vazokonstriktör etkisini tersine çevirme eğilimindedir (116). Venlerde ise bunun tersi söz konusudur. İ/R hasarında endotelin/NO oranı endotelin lehine bozulur. Sonuçta arteriyel vazokonstriksiyon, venlerde vazodilatasyon olur.

Endotel hücrelerinin oksidatif stresi sonucu kompleman aktive edilir; lökosit adhezyon moleküllerinin üretimi artar. SOR etkisi ile endotel hücreleri hasara yanıt olarak İL-1, PAF, prostaglandinler (PG I₂, PG E₂), GM-CSF, büyüme faktörleri, endotelin, NO ve tromboksan A₂ (TxA₂) salgırlar. Aktive olan endotel hücreleri ek olarak kendi bazal membranlarını sindiren kollajenazlar salgılama yeteneğindedir (117). Nitrik oksitlerin radikal olarak reaktivitesi düşüktür, ancak metal içeren bileşikler ve radikaller ile büyük bir hızla tepkimeye girerler. Özellikle lipit radikallerle tepkimeye girmesi NO'ya antioksidan bir etki kazandırır. Fizyolojik derişimde üretilen NO, esas olarak oksihemoglobin tarafından nitrata (NO₃-) oksitlenerek aktivitesi sonlandırılır. Oksijen radikallerindeki durumun aksine, nitrik oksidi ortamdan temizleyen herhangi bir özel enzim yoktur. İndüklenebilir nitrik oksit sentaz enziminin indüksiyonu sırasında NO derişiminin artması ile oksidasyonu da hızlanır ve çeşitli reaktif nitrojen oksit türleri oluşur. Bu reaktif türler NO'nun dolaylı etkilerinden sorumludur ve hücresel moleküllerin nitrozilasyonuna, nitrasyonuna, nitrozasyonuna yol açarak, proteinlerin ve enzimlerin aktivitelerinin sonlanmasına neden olabilirler (116-118).

2.4. Flep Cerrahisi ve Anestezi

Mikrovasküler serbest flep transfer cerrahisi geçirecek hastaların anestezi dolaşım fizyolojisini bilmeyi gerektirir. Bu tip operasyonların başarılı olması için tek bir sihirli yöntem yoktur. Fakat elde edilen deneyimler damar spazmı ve/veya tıkanıklığını büyük oranda azaltmıştır. Bu tip operasyonlar zaman alıcıdır ve ortalama 8-10 saat sürer. 16 saat süren operasyonlar da bildirilmiştir. Bu girişimler sırasında operasyon ekibinin karşılaştığı başlıca problemleri temel olarak uzamış anestezi ve cerrahi, hasta ısısının kontrolü, flepte kan akımının sağlanması, operasyon sonrası bakım olarak sıralayabiliriz (121,123,124,128,136). Transplantasyon yapılacak flebin damarları 1-4 mm'dir ve direnç damarları kategorisine girer. Duvarlarında büyük miktarda düz kas bulunur. Bu kaslar da dokunma, soğuk veya refleks aktivite sonucu kolaylıkla spazm gelişerek operasyonun başarısını tehlikeye atabilir (131,133,136). Transplante edilen dokudaki damarlar denerve olmasına rağmen halen fiziksel ve humoral etkilere açıktır.

2.4.1. Fizyolojik prensipler

Sıvıların rijid tüpler içinden laminar akımını etkileyen faktörlerin etkileşimi Poiseuille-Hagen formülüyle tanımlanmıştır.

$$\text{Akım} = (P_A - P_B) \times \left(\frac{n}{8} \right) \times \left(\frac{1}{n} \right) \times \left(\frac{r^4}{L} \right)$$

$P_A - P_B$ = tüpün iki ucu arasındaki basınç farkı

n = vizkosite

r = tüpün yarıçapı

L = tüpün uzunluğu

Dolaşım bu formüle dayanmakla beraber, transplante edilen dokudaki basınç gradientinin temel belirleyicisi sistemik arteriyel basınçtır.

Akım yarı çapının dördüncü kuvveti ile ilişkili olduğundan, kesit alanındaki küçük değişiklikler bile akımda büyük değişikliklere neden olur. İç çapın 1.5 mm'den büyük olduğu damarlarda vizkosite hematokrit ile yakından ilişkilidir. Ancak bu ilişki lineer değildir ve hematokrit %40'ın üstüne çıktığında vizkosite dramatik olarak artmaya başlar.

2.4.2. Mikrosirkülasyon

Flebin mikrodolaşımında perfüzyon basıncı, damar çapı ve vizkosite ile ilgili üç prensip geçerlidir. Bunlardan en önemlisi kan vizkositesidir. Kan vizkositesi akım şartlarıyla değişmektedir. Akım çok hızlı olduğunda vizkosite azalırken, hız kritik değerin altına indiğinde eritrositlerin bir ekseninde akışları oluşmaz ve hücreler damar içinde eşit olarak dağılırlar. Böylece vizkosite hematokrite oranla çok artar. Eritrositler damar duvarı ile temas edebilirler ve akım daha da yavaşladığında üç boyutlu rulo oluşturacak şekilde birleşerek akıma karşı direnci büyük oranda arttırırlar Bu rulo formasyonu geri dönüşümlüdür. Moleküler ağırlığı 59.000'den büyük olan dekstranlar eritrositlerin agregasyonunu predispoze ederken, daha küçük moleküler ağırlıklı dekstranlar ruloların yıkımına neden olurlar (125-127,136). Mikrovasküler cerrahide anestezi planı yüksek kardiyak debi, uygun vazodilatasyon ve büyük bir nabız basıncı ile hiperdinamik bir dolaşım sağlama olmalıdır. Bu sadece transplante dokuda yeterli perfüzyonu sağlamakla kalmaz, aynı zamanda anastomoz bölgelerinde trombosit yığılma riskini de minimale indirir.

2.4.3 Arteriyel basıncın kontrolü

Vazodilatasyonla birlikte uygun bir arteriyel basınç bölgesel kan akımı sağlayarak mikrodamarların yeterliliğini arttırıp mikrodolaşımda kanın akıcılığını sağlayarak iyi bir doku perfüzyonuna neden olur. Yeterli kardiyak rezervleri olan hastalarda kardiyak dolum basıncında kontrol ölçümünden yaklaşık iki mmHg kadar yükseltilmesi kardiyak debiyi iki katına çıkaracak, aynı zamanda cilt ve kaslarda vazodilatasyona neden olacaktır. Bu kısmen gerilim mekanizmasının kısmen de düşük basınç kardiyopulmoner refleksleri aracılığı ile olmaktadır (122,129,130).

Volüm genişleticilerinin infüzyonu ile sağlanan hemodilüsyon doku perfüzyonunu daha da arttırır. Ancak bu hemodilüsyon oksijen transportunu tehlikeli derecede azaltacak kadar olmamalıdır. Konsantre eritrositlerin transfüzyonu sonucu hematokritte olan artış ise vizkositeyi arttırır ve doku perfüzyonunu bozar. Elektrolit solüsyonları tek başlarına volüm ekspansiyonu oluşturmada yetersizdirler ve hatta ödeme neden olarak flebin ömrünü kısaltırlar. Tercih edilen uygulama dekstran 40 ile eşit volümde ringer laktat karışımıdır.

2.4.4. Karbondioksit kontrolü

Karbondioksit basıncındaki artışın tüm etkisi periferik vasküler dirençte bir azalmayla birlikte kardiyak debi, kalp hızı ve kan basıncında artış olmasıdır. Karbondioksit basıncını normal değerinin üstünde tutmak, transplante dokunun perfüzyonu için optimal dolaşımsal şartları sağlamasının çekici bir yolu olabilir (132).

2.4.5. Isı kontrolü

Serbest doku flebi transfer cerrahisinde flep denerve ve iskemiktir. Bu her iki olay vazodilatasyona predispozan faktörlerdir. Fakat flebin alındığı andan itibaren, cilt ısısında oluşabilen lokal bir düşüş kan akımında aynı oranda azalmaya neden olur. Anestezi sırasında vazokonstriksiyon azalmakla birlikte derlenme döneminde önem kazanır. Isının korunmasında en pratik çözüm ameliyathane ısını korumaktır (134). Önerilen ısı yirmi dört derecedir.

2.4.6. Ağrının kontrolü

Ağrı ve anksiyete vazomotor tonüste artışa neden olduğundan dolaşımsal açıdan önemlidir. Ekstradural, paravertebral veya supraklavikular aksiller kateter ile lokal anestezik uygulaması, sürekli intravenöz opiat verilmesi, izofluran anestezisi, droperidol, papaverin ve timoksamin vazomotor tonüsü ayarlama da kullanılırlar.

Anestezinin derleme dönemindeki titreme ve vazokonstriksiyon promazin ve klorpromazinin küçük bolusları kullanılarak kontrol edilmelidir (135,136). Operasyon bittiğinde dahi dokunun canlılığı dikkat gerektirir. Postoperatif labil seyreden kardiyovasküler durum dikkatle izlenmeli ve mikrovasküler staz kısır döngüsünün başlamasına olanak verilmemelidir.

2.5. Flep Cerrahisinde Anestezik Yöntemler

2.5.1. İnhalasyon anestezisi

İnhalasyon anestezisi, flep cerrahisinde uzun süren operasyonlarda tercih edilen bir anestezi yöntemidir. İnhalasyon anestezisi, hasta stabilitesi, hava yolu bütünlüğünün sağlanması, ventilasyonun fizyolojik koşullara uygun olarak sürdürebilmesi, kontrolünün kolay olması, anestetik maddenin konsantrasyonunun monitörize edilerek hassas şekilde kontrolü ve anestezi seviyesinin hızlı şekilde değiştirilmesine imkan vermesi, maliyet ve hızlı uyanma gibi çeşitli avantajları nedeniyle tercih edilen anestezi şeklidir. İnhalasyon anestezisi sırasında cerrahiye endokrin ve metabolik yanıtın baskılanmadığı, cerrahi uyarının hipotalamo-hipofizer sistemi harekete geçirdiği, katekolaminlerin, ACTH, kortizol gibi hormonların ve kan şekerini arttırdığı bilinmektedir. İnhalasyon anestezisinden sonra kusma, ajitasyon ve titreme gibi yan etkiler gelişebilmektedir. Katekolaminlerin artışı vazospazma ve kan akımında azalmaya neden olmaktadır. Ayrıca, mikrocerrahi operasyonlarında, yeterli hacim replasmanı sağlanmadığı durumlarda ise katekolaminlerin, vazospazm üzerine olan etkileri daha da artmaktadır. Çeşitli avantajlarından dolayı, flep cerrahisinde en çok tercih edilen inhalasyon anestezisi ajanı izofloran'dır. Halotan, hepatotoksik olması nedeniyle, enfloran ise flor içermesi nedeniyle uzun süreli flep cerrahilerinde tercih edilmemektedirler. İzofloran ise halojenli bir eterdir ve enfloran'ın izomeridir. İzofloran kanda çözünürlüğü düşük olmasından dolayı daha çabuk indüksiyon yapmakta ve çizgili kasları halotandan daha fazla gevşetmektedir (25-27,124,132,134,135).

İzofloran ayrıca, mikrocerrahi operasyonlarda hızlı derlenme, yeterli periferik vazodilatasyon oluşturmaması, özel organ toksitesi olmaması, kardiyak outputu azaltması, serebral kan akımını artırması ve renal kan akımını koruması gibi özellikleri nedeni ile tercih edilecek en uygun ajanlardan biridir. İzofloran'ın bu sistemik vazodilatasyon etkisi nedeniyle, hipovolemik hastalarda, hiperdinamik sirkülasyonun devam ettirilmesi özellikle tavsiye edilir. Yine anestezinin başlangıç periyodunda gerektiği durumlarda enfluran ve halotanı vaporize etmek için de nitroz oksit ve oksijen 70:30 oranında kullanılabilir. Başlangıçta inhalasyon anestetiklerini desteklemek sonrasında da replase etmek amacıyla fentanil, morfin ve/veya ketamin kullanılabilir. Yine operasyonun ilerleyen evrelerinde, inhalasyon anestetiklerine uzun süreli maruz kalmayı önlemek amacıyla alfaksalone ve alfadolone asetat infüzyon şeklinde kullanılabilir. Gerektiğinde ve pratik olarak mümkün olduğunda 24 saat epidural blok kullanılabilir (30-33,36,39,124,128).

Sevofluran kapiller filtrasyon katsayısını düşürmektedir. Sevofluran intravenöz anestetiklerle örneğin propofolle kıyaslandığında plazmanın hücrelerarası mesafeye ekstrasvazasyonunu azalttığı ve böylece doku ödemi sınırlayarak mikrosirkülasyon üzerinde daha yararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Kapiller filtrasyon katsayısının düşmesinin anlamı, özellikle postoperatif 1. günde sıvı intravenöz olarak verildiğinde doku ödeminin daha az bir olasılıkla meydana gelmesi demektir (132).

Tek başına hiçbir anestetik ajan ideal anestezi sağlamamaktadır. Anestetiklerin kombinasyonu ile yapılan anestezi ise ideale daha yakın olmaktadır. Opioidler sıklıkla genel anesteziye adjuvan olarak kullanılmaktadır. Bunlar entübasyon ve cerrahi stimulusa olan hemodinamik cevabı en aza indirirler, gereken genel anestetik miktarını azaltırlar ve erken postoperatif dönemde analjezi sağlarlar.

Eğer kombine bölgesel ve genel anestezi kullanılırsa, intravenöz opioid ve non-depolarize kas gevşeticiler sadece operasyonunun başlangıcında ve ventilatördeki ihtiyaç açısından gereklidirler. Genel anestezi tek başına kullanılacaksa non-depolarize kas gevşeticiler sıklıkla kullanılırlar. Bu durumda histamin serbestleştirme ve sempatolitik etkisi en az olan vekuronyum kullanılabilir. Yine hasta ciddi

hipertansiyon hastası ve dolayısıyla periferik vazodilatasyonlu olmadığı takdirde pankuronyum da mikrocerrahide güvenle kullanılabilir. İzofluran, desfluran, sevofluran ve propofolle yeterli hipnoz sürdürülebilir (23,25).

Fentanil, hemodinamik stabilite ve myokardiyumu iskemik hasara karşı koruma sağlaması nedeniyle mikrocerrahide uygun bir analjeziktir. Remifentanil, çok kısa etkili farmakokinetik profili olan bir intravenöz opioiddir ve fentanilden daha az güçlü bir etki gösterir. Remifentanil; hızlı bir uyanma arzu ediliyorsa, anestetik gereksinimi hızlı bir dalgalanma gösterdiği durumlarda, opioid titrasyonunun zor olduğu durumlarda, ve yüksek doz opioid gerektiren durumlarda oldukça uygun bir ajandır. Remifentanil, arteriyel basıncın hızlı kontrolünü ve sistemik vazodilatasyonu sağladığı ve aynı zamanda hiperdinamik sirkülasyona sürdürdüğü için mikrocerrahide iyi bir seçenektir (138).

Özellikle geniş malign tümör cerrahileri, lenf nodu diseksiyonu ve geniş musküler flep cerrahileri gibi uygulamalarda kan kaybının azaltılması için hipotansif anestezi gerekebilir. Genel anestezi ile kombine edilen epidural ya da spinal anestezi ile hipotansif anestezi sağlanabilir. Sodyum nitroprusid, kardiyak debiyi sürdürmesine rağmen, sistemik vasküler rezistansı ve arteriyel basıncı düşürerek serbest flep kan akımında önemli bir azalmaya neden olur (28).

2.5.2. Total intravenöz anestezi

Son zamanlardaki bazı çalışmalar anestetik tekniğin prone pozisyonunda hemodinamik değişkenleri etkileyebileceğini düşündürmektedir. Spinal cerrahi yapılan hastalarda, total intravenöz anestezi (TİVA) ile inhalasyon anestezisi, ortalama arteriyel basınç ve kalp hızı yönünden karşılaştırılmış ve TİVA grubunda arteriyel basınçta daha büyük düşüş görülmüştür. İnhalasyon ve intravenöz anestezinin serbest fleplerin kan akımına olan etkilerinin tam olarak belirlenebilmesi için daha çok klinik ve deneysel çalışmalara ihtiyaç olduğu kesindir (133,134,139).

2.5.3. Bölgesel anestezi

Mikrocerrahi operasyonlarda, brakial pleksus blokajı, epidural ve spinal anestezi gibi bölgesel anestezi teknikleri de kullanılmaktadır. Bölgesel anestezi, sempatik blok oluşturarak, periferik vazospazmı önlemektedir. Ayrıca, derin venöz tromboz oluşma riskini ve intraoperatif kan kaybını azaltır, diafragmatik fonksiyonları düzeltir ve postoperatif dönemde iyileşme ve toparlanma sürecini hızlandırır (23,25,135).

Devamlı pleksus blokajı iyi bir sirkülasyon sağladığı gibi analjezik etkisinden dolayı ek olarak analjezik kullanımını da engeller. Ayrıca simültane sempatik blokaj perfüzyonu artırır ve özellikle replantasyonlar sırasında intraoperatif ya da postoperatif oluşabilecek spazmı önler. Devamlı sempatik blok yapabilmek için kateter yerinde bırakılabilir ve birkaç gün boyunca anestetik solüsyon devamlı ya da aralıklı olarak verilebilir (124,125,140). En sık kullanılan rejional blok tekniği devamlı epidural anestezi ve brakial pleksus blokajıdır. Devamlı epidural ya da aksiller pleksus blokajı için operasyon sırasında mepivakin 20 ml/mL iyi bir seçenek olarak kullanılabilir. Yeterli bir analjezi ve yeterli kas gevşemesi sağlar. Postoperatif dönemde düşük doz bupivakin 0.625-1.25 mg/mL ise daha iyi bir seçenektir (128,136,137).

2.5.3.1. Epidural anestezi

Epidural anestezi birçok cerrahi işlemde tercih edilebilen güvenli ve etkili bir bölgesel anestezi yöntemidir. Anestezik ajanın spinal sinir kökü seviyesine uygulanması ile sempatik blokaj ve vazodilatasyon ortaya çıkmakta ve vazospazmı önlemektedir. Ayrıca epidural narkotiklerin kullanılması mükemmel analjezi sağlanmakta ve sistemik katekolaminlerin salınmasını azaltmaktadır (28,44). Epidural anestezi sonucu oluşan ağrı azalma ve vazodilatasyon, cerrahi işlem boyunca ve erken postoperatif dönemde hem flebe olan kan akımının hem de flebin kendi içindeki kan akımının iyileşmesine neden olmaktadır (45,141).

2.5.3.2. Spinal anestezi

Bu yöntemde, lokal anestezik ajan, L2 vertebra hizasında subaraknoid aralığa yani serebrospinal sıvı içine enjekte edilmektedir. Böylece hem ön hem de arka köklerde bulunan sinir lifleri bloke edilmektedir. Lokal anesteziye duyarlı gama motor aksonlarının blokajıyla kaslarda gevşeme ve T1 ile L2 arasındaki pregangliyonik sempatik liflerde iletimin kesilmesi nedeniyle de kan basıncında belirgin düşme meydana gelebilmektedir. Ayrıca, anestezinin etkisi torakal ve servikal bölgelere de yayılabilmektedir. Bu tür olumsuz etkilerinden dolayı serbest flep cerrahisinde kullanımı oldukça kısıtlıdır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Deneysel çalışmaya başlamadan önce Dicle Üniversitesi Tıp Fakültesi Yerel Etik Kurul Başkanlığından yerel etik kurul onayı alındı (31 Mayıs 2010 tarih ve 2010/11 sayılı). Denekler Dicle Üniversitesi Prof. Dr. Selahattin Payzın Deneysel Araştırma Merkezinden (DÜSAM) elde edildi. Çalışmaya 40 adet dişi, 250-300 gr ağırlığında, izogeneik (inbret) Sprague-Dawley albino sıçan dahil edildi. Sıçanlar standart toplu kafeslerde barındırıldı. Yemler standart pellet şeklinde verildi (TAVAS Inc, Adana, Türkiye) ve su ihtiyaçları standart yöntemlerle karşılandı. Oda ısısı yaklaşık 21 °C’ de sabit tutuldu. Laboratuvar ışıklandırması 12 saat gündüz ve 12 saat gece olacak şekilde ayarlandı. Odanın nem derecesi % 45 $\pm$ 10 düzeyinde sabit değerde tutuldu. Tüm prosedürler tek cerrah tarafından uygulandı.

3.1 Deney Planı

Sıçanlar randomizasyon listesine göre seçilerek her bir grup on 10 sıçandan oluşacak şekilde dört grup oluşturuldu. Grup I herhangi bir bölgesel anestezi ve İ/R yapılmayan grup (sham grubu), grup II herhangi bir bölgesel anestezi yapılmadan İ/R uygulanan grup (İ/R, kontrol grubu), grup III epidural anestezi altında İ/R yapılan grup, grup IV ise spinal anestezi altında İ/R yapılan grup şeklinde planlandı. Tüm sıçanlarda anestezi için 90 mg/kg ketamin (Ketalar flakon; Pfizer Ltd Şti, İstanbul, Türkiye) ve 10 mg/kg xylazine (Rompun flakon, Bayer Inc, Almanya) intraperitoneal uygulandı. Tüm sıçanların abdominal bölgeleri traşlandıktan sonra %10’luk povidon iyodin solüsyonu (Batticon, Adeka İlaç Ltd Şti., Samsun, Türkiye) ile dezenfekte edildi. Spinal ve epidural anestezi için kateterizasyon işlemi yapılacak sıçanların sırt bölgesi traşlanıp %10’luk povidon iyodin solüsyonu (Batticon, Adeka İlaç Ltd Şti., Samsun, Türkiye) ile dezenfekte edildi. Ayrıca bütün sıçanlara antikoagülasyon amacıyla 150 İÜ/kg heparin (Nevparin, 5000 İÜ/ml, Mustafa Nevzat) intraperitoneal yapıldı. Operasyondan bir saat önce sefazolin sodyum 0.25 gr/kg (sefazol flakon, Mustafa Nevzat İlaç Sanayi, İstanbul, Türkiye) intramüsküler yolla uygulandı. Yine operasyondan bir saat önce cerrahiye bağlı sıvı açığını yerine

koymak amacıyla intraperitoneal 1.5 cc serum fizyolojik enjekte edildi. Anestezisi süresince oluşabilecek hipotermiden korunmak amacıyla tüm sıçanlar masa lambası ile ısıtıldı. Ayrıca hipertermi ve dehidratasyondan kaçınmak amacıyla baş bölgeleri alüminyum folyo ile kapatıldı. Her saat başı tüm deneklerin vücut ısıları rektal termometre ile ölçülerek $36\pm2^{\circ}\text{C}$ aralığında olduğu teyit edildi.

Sham grubunda İ/R uygulanmadan diğer gruplarda ise İ/R'nu takiben tüm fleplerin orta kısmından 1×1 cm boyutlu kas örnekleri alındı. Alınan doku örnekleri enflamasyon bulguları, hyalinizasyon ve nükleer değişiklikleri histopatolojik olarak göstermek için; total antioksidan kapasite (TAK), total oksidatif stres (TOS), paraoksonaz (PON), malondialdehit (MDA), nitrik oksit (NO) düzeylerini biyokimyasal olarak ölçmek için ayrıldı (tablo 2). Biyokimyasal çalışmalar için örnekler -40°C 'de saklandı. Histolojik çalışma için örnekler oda sıcaklığında formaldehit içinde saklandı.

3.2. Deney Grupları

Tablo 2: Deney planı ve gruplar

İşlemler/Gruplar	Grup I (sham, n=10)	Grup II (kontrol n=10)	Grup III (epidural, n=10)	Grup IV (spinal, n=10)
Flep elevasyonu	+	+	+	+
İskemi (4 saat)	—	+	+	+
Reperfüzyon (2 saat)	—	+	+	+
Bölgesel Anestezi	—	—	+	+
Biyopsi alımı	+	+	+	+

3.2.1. Grup I (Sham grubu)

Bu gruptaki 10 ratta TRAM flebi süperior pediküllü olarak hazırlanıp pedikül korunarak herhangi bir iskemi yapılmadı. Epidural veya spinal anestezi amacıyla ekstradural veya intradural herhangi bir kateterizasyon işlemi yapılmadı. Flep kaldırıldıktan sonra altıncı saatte flep ortasından kas doku örnekleri alınıp biyokimyasal inceleme için -40 °C’de ve histopatolojik inceleme için oda sıcaklığında formaldehit solüsyonunda saklandı.

3.2.2. Grup II (İ/R, Kontrol grubu)

Bu gruptaki 10 ratta TRAM flebi süperior pediküllü olarak hazırlanıp standart mikroklempten yardımıyla 4 saatlik iskemi takiben iki saatlik reperfüzyon uygulandı. Epidural veya spinal anestezi için ekstradural veya intradural herhangi bir kateterizasyon işlemi yapılmadı. Reperfüzyonu takiben flep ortasından kas doku örnekleri alınıp biyokimyasal inceleme için -40 °C’de ve histopatolojik inceleme için oda sıcaklığında formaldehit solüsyonunda saklandı.

3.2.3. Grup III (Epidural anestezi grubu)

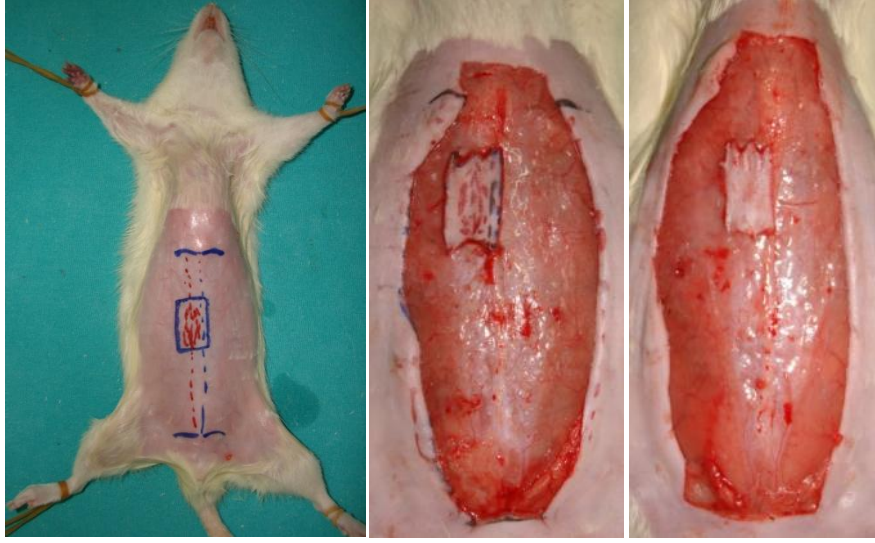
Bu gruptaki 10 ratta epidural anestezi için ekstradural kateterizasyonu takiben sıçanlarda nörolojik defisit gelişip gelişmediğini gözlemlemek için 72 saat beklendi. Nörolojik defisit gelişmeyen sıçanlara epidural anestezi için %2 lidokain 50 µl oranında sıçanların kendi ağırlıklarını kaldıramayınca kadar ve gövdeleri ile karınları yüzeye dokununcaya kadar epidural kateterizasyon ile verildikten sonra TRAM flebi süperior pediküllü olarak hazırlandı. Standart mikroklempten yardımıyla 4 saatlik iskemi uygulandı ve ardından 2 saatlik reperfüzyon işlemi yapıldı. Reperfüzyonu takiben flep ortasından kas doku örnekleri alınıp biyokimyasal inceleme için -40 °C’de ve histopatolojik inceleme için oda sıcaklığında formaldehit solüsyonunda saklandı.

3.2.4. Grup IV (Spinal anestezi grubu)

Bu gruptaki 10 ratta spinal anestezi için intradural kateterizasyonu takiben sıçanlarda nörolojik defisit gelişip gelişmediğini gözlemlemek için 24 saat beklendi. Nörolojik defisit gelişmeyen sıçanlara spinal anestezi için %2 lidokain 25 µl oranında sıçanların kendi ağırlıklarını kaldıramayınca kadar ve gövdeleri ile karınları yüzeye dokununcaya kadar spinal kateterizasyon ile verilip TRAM flebi süperior pediküllü olarak hazırlandı. Standart mikroklemple 4 saatlik iskemi ve ardından 2 saatlik reperfüzyon işlemi yapıldı. Reperfüzyonu takiben flep ortasından kas doku örnekleri alınıp biyokimyasal inceleme için -40 °C’de ve histopatolojik inceleme için oda sıcaklığında formaldehit solüsyonunda saklandı.

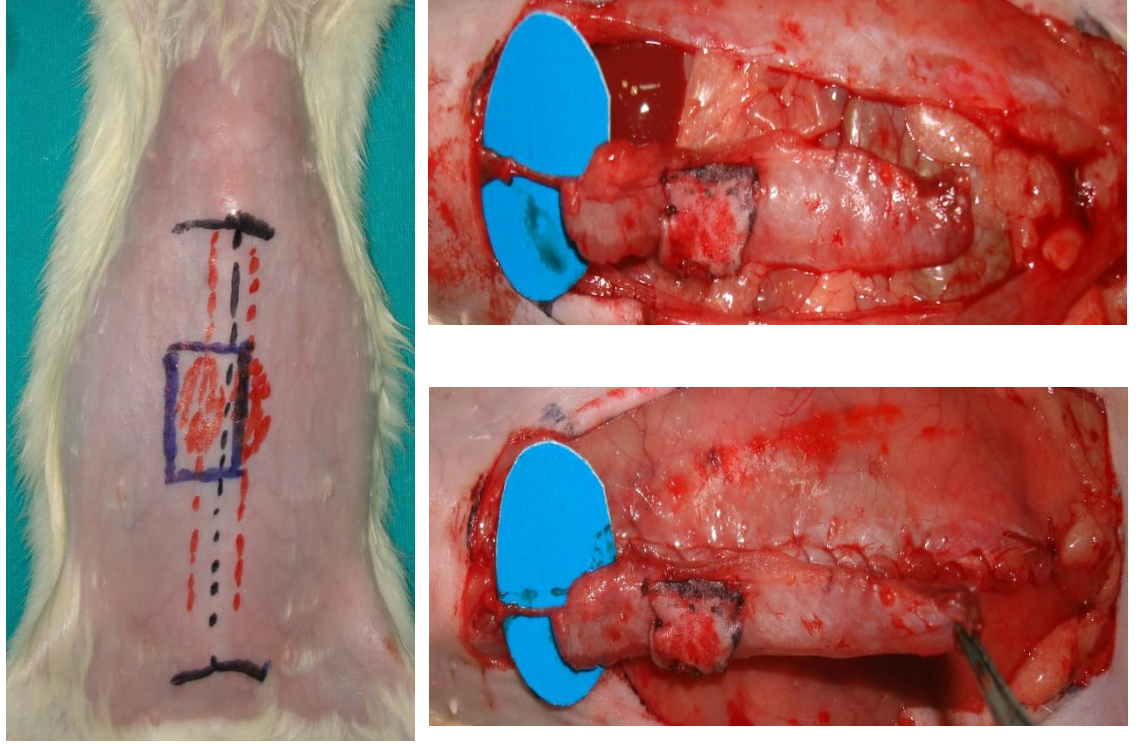
3.3. Flep Modeli

Çalışmada Özgentaş ve arkadaşlarının kullandığı flep model alınarak, pedikülü derin süperior epigastrik arteri içeren kas-deri flebi kullanıldı. Ratlarda TRAM flebi ince ve uzun yapısıyla üç gr ağırlığında ve 4×1 cm boyutlarında hazırlandı. Kas-deri flebinde deri adası rektus abdominis kasını her iki yanda en fazla iki mm aşacak şekilde planlandı. Perforatörlerin olası dağılımına göre deri adasının aşağı sınırı pubisin yaklaşık 2-2.5 cm yukarısında, yukarı sınırı ise ksifoidin 1 cm aşağısında planlandı. Planlanan deri adasını çepeçevre dolaştıktan sonra yukarıda ksifoid aşağıda da pubise doğru uzatılan kesi ile deri katı geçildi. Deri adasının alttaki kas tabakasından sıyrılmasına özen gösterildi ve deri adası poliglekapron 25 (Monocryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) 7/0 dikiş ile alttaki kas tabakasına dikildi (Şekil 7). Kas planına ulaşıldıktan sonra linea alba uzunlamasına kesildi. Rektus kasının çok ince olan fasya kılıfının açılması ve kasın kılıf içinden disseksiyonu insandaki kadar kolay olmaması ve insandaki verici bölge morbiditesi kaygıları ratlarda ikinci planda kalmaması nedeniyle rektusu çevreleyen fasya kılıfının disseksiyonuna çok özen gösterilmedi. Kas-deri flebi için üstteki deri adası korunduktan sonra kas fasya kılıfından çıkarılmadan disseksiyon yapıldı. Linea alba tarafından girilip alt yüze ulaşıldıktan sonra yukarıda ksifoid aşağıda da pubise kadar medial kenar açıldı. Sonra rektus abdominis kasının lateral kenarı belirlendi.

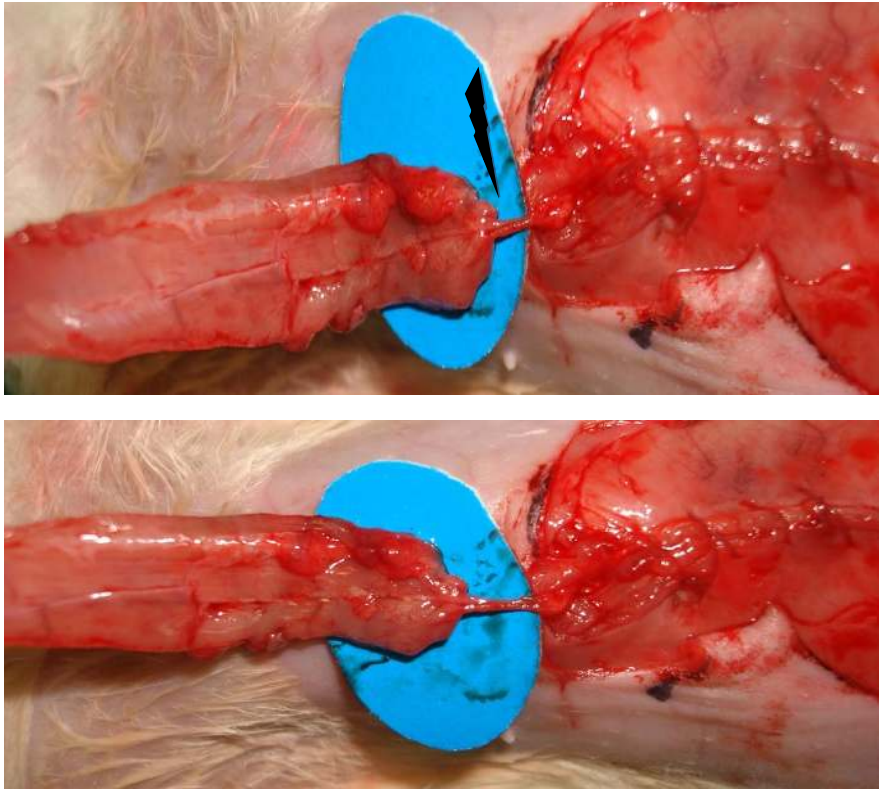


Şekil 7: TRAM flebinin kaldırılması amacıyla planlanan deri insizyonu

Disseksiyon rektus kasının pubis 1 cm kadar yukarısından kesilip inferior epigastrik damarların ve yan dalların koterize edilmesiyle devam edildi. Aşağıdaki tüm bağlantılar kesildikten sonra kas yukarıya doğru serbestleştirildi. Lateraldeki ince damarsal bağlantılar ve interkostal sinirler kesilip ayrılarak sternuma kadar disseksiyon tamamlanıp flebin süperior pediküllü kas-deri flebi olarak hazırlanması tamamlandı (Şekil 8). Kası ve üzerindeki deriyi besleyen yalnız süperior epigastrik sistem bulunmaktadır (Şekil 9). Flepin süperiorunda kasın alt yüzünde internal meme damarlarının devamı olan süperior epigastrik damarların yansıması izlenerek çevredeki kas lifleri kesildi. Derin süperior epigastrik damarlar dikkatle iskeletize edildikten sonra vazospazmı engellemek amacıyla %2'lik lidokain ile damarlar yıkanarak vazodilatasyon sağlandı. Kas-deri flebi hazırlandıktan sonra karın duvarı kas ve deri olarak ikit kat halinde; kas dokusu 3.0 poliglaktin (Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) dikiş ve cilt 3.0 ipek (Silk, Doğan Ltd Şti, Trabzon, Türkiye) dikiş ile primer suture edilerek kapatıldı.



Şekil 8: Flebin oluşturulması ve ön karın duvarının onarılması



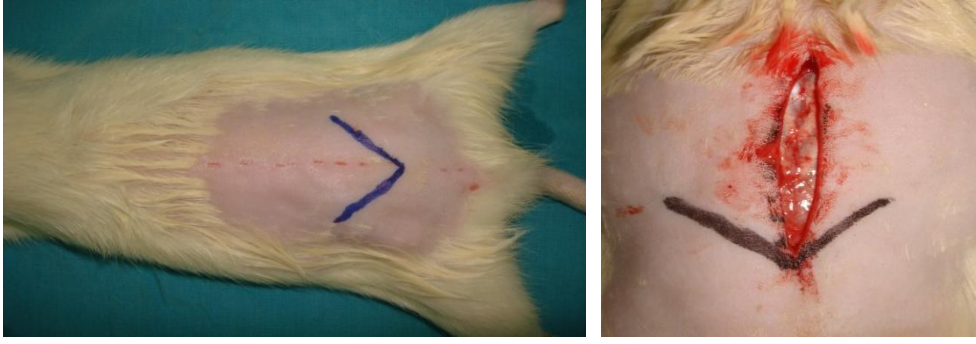
Şekil 9: TRAM flebini besleyen derin süperior epigastrik arterin görünümü (⚡)

3.4. Bölgesel Anestezi Modelleri

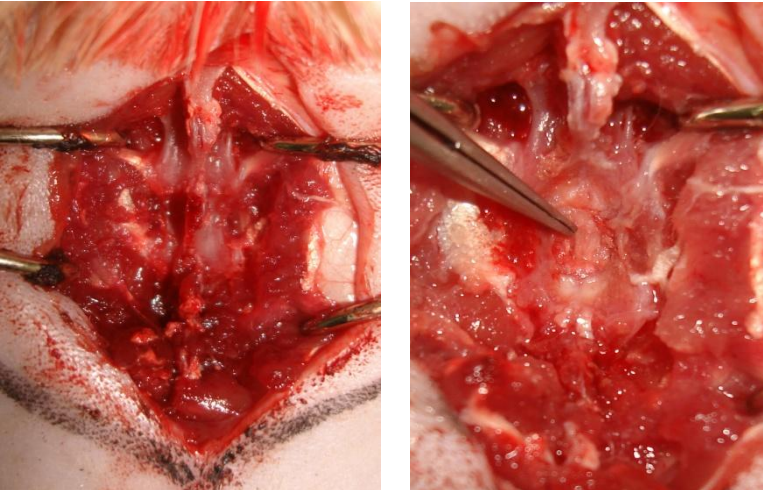
3.4.1. Epidural anestezi modeli

Ekstradural kateterizasyon amacıyla ratların sırt bölgesi lumbar sahadan spinöz prosesler elle hissedilip orta hat insizyonu ile girilerek paravertebral fasya ortaya kondu (Şekil 10).

Şekil 10: Epidural anestezi amacıyla planlanan deri insizyonu ve paravertebral fasya

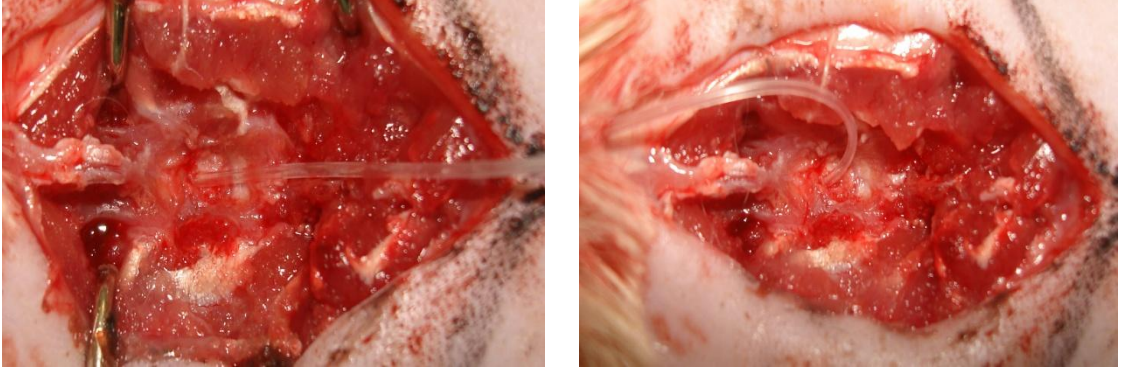


Şekil 11: L4-L5 vertebra ve duranın görünümü



Fasya orta hat insizyonunu takiben elevatör yardımıyla künt ve keskin disseksiyonla paravertebral kaslar sıyrılıp ekarte edildi (142). L4-L5 vertebral gövde

ortaya kondu. Spinöz prosesler traşlanıp orta hattan delik açıldı (Şekil 11).



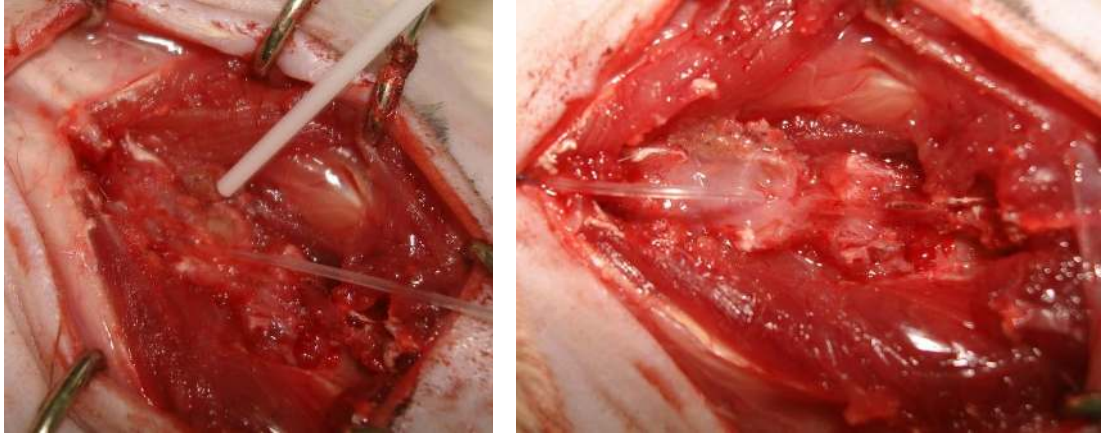
Şekil 12: Polietilen tüpün yerleştirilmesi ve spinöz proseslere fiksasyonu

Dura ve spinal kord korunarak dura üzerinden epidural anestezi için kannülasyon amacıyla polietilen tüp (P.E.; i.d. 0.28 mm ve o.d 061 mm, Becton Dickinson, Philadelphia, USA) servikal yönde yaklaşık 10-15 mm ilerletildi ve 4.0 poliglaktin (Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) dikiş ile proksimaldeki spinöz prosese fiks edildi (Şekil 12).

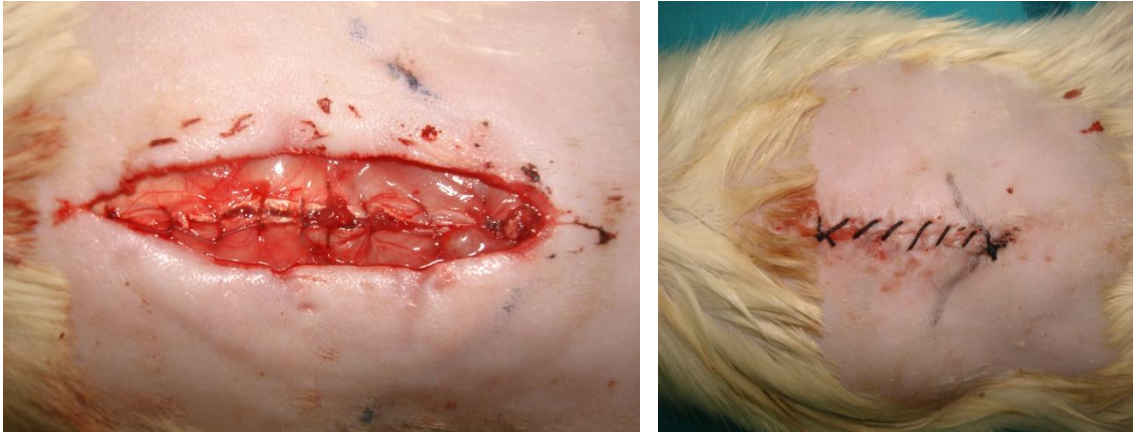


Şekil 13: TISSEEL VH, buharla steril edilmiş iki bileşenli bir fibrin yapıştırıcıdır.

Kateter yerleştirilmesi ve fiksasyonunu takiben vertebral kemikte açılan delik fibrin matriks (TISSEEL VH) kapatıldı (Şekil 13-14). Polietilen tüpün diğer ucu cilt altından künt keskin disseksiyonla tünel oluşturulup kulak arkasından çıkartıldı. Paravertebral kaslar ve paravertebral fasya 5.0 poliglaktin (Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) dikiş ile primer suture edilerek kapatıldı (Şekil 15-16).



Şekil 14: Vertebrada açılan deliğin kapatılması amacıyla fibrin matriks yerleştirilmesi



Şekil 15: Paravertebral kas ve fasya ile yapılan insizyonun primer onarımı



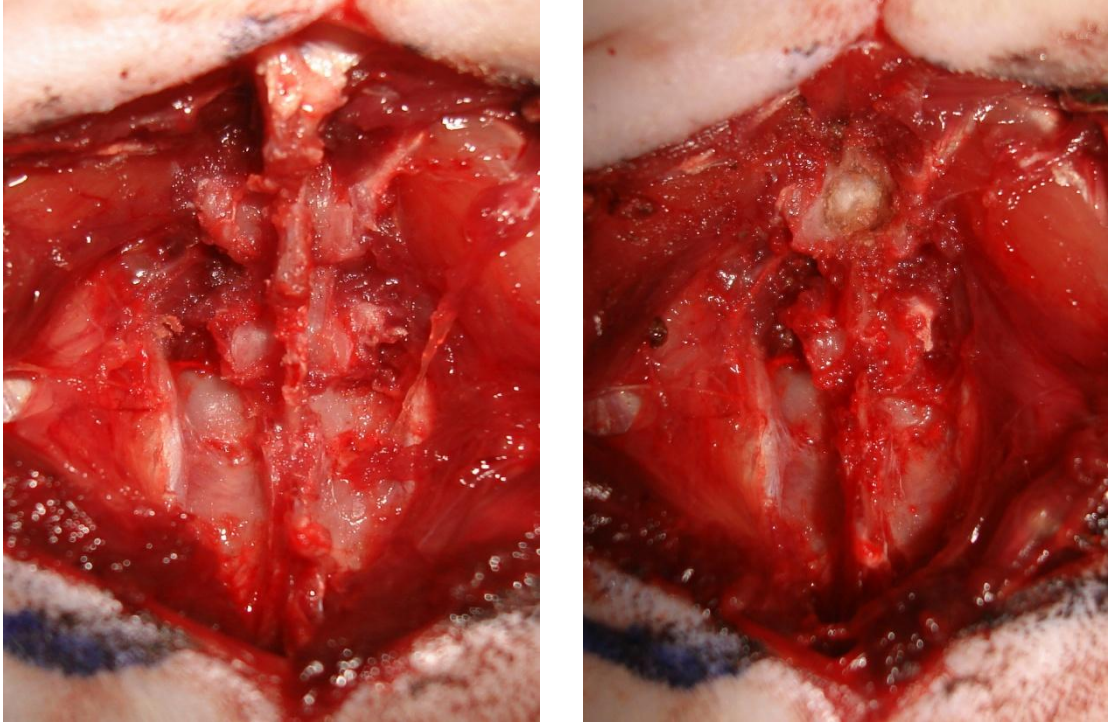
Şekil 16: Kateterizasyon amacıyla yerleştirilen polietilen tüp tünelize edilerek kulak arkasından çıkarılması

3.4.2. Spinal anestezi modeli

İntradural kateterizasyon amacıyla ratların sırt bölgesi lumbar sahadan spinöz prosesler elle hissedilip orta hat insizyonu ile girilerek paravertebral fasya ortaya kondu (Şekil 17). Fasya orta hat insizyonunu takiben elevatör yardımıyla künt ve keskin disseksiyonla paravertebral kaslar sıyrılıp ekarte edildi. L₄-L₅ vertebral gövdeler ortaya kondu. Spinöz prosesler traşlanıp orta hattan delik açıldı (Şekil 18).

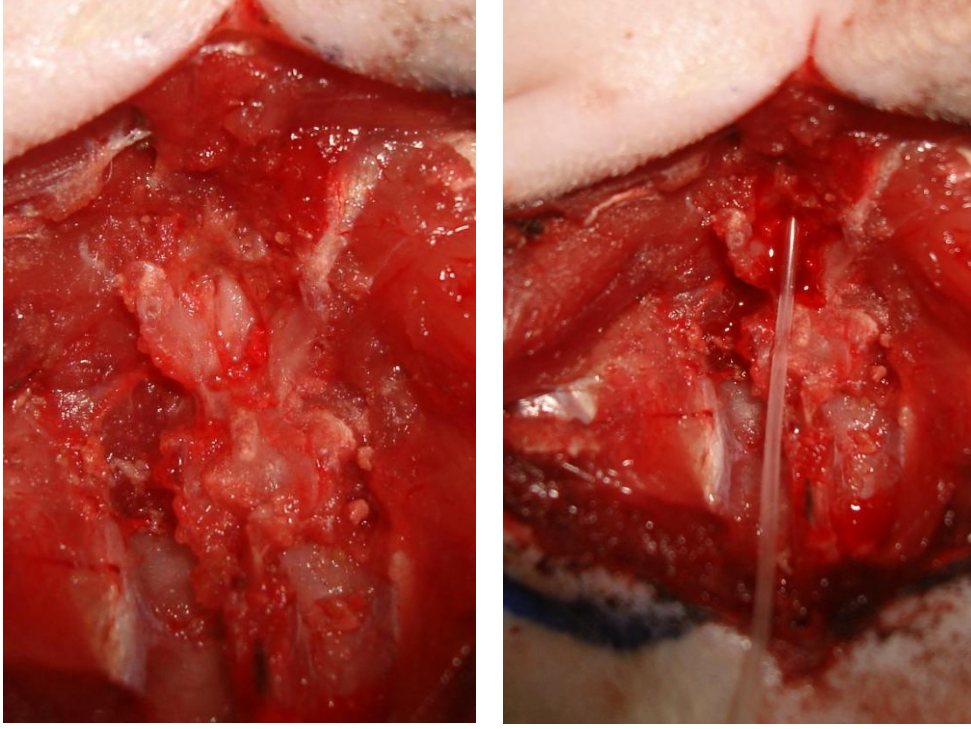


Şekil 17: Spinal anestezi için planlanan deri insizyonu



Şekil 18: L4-L5 vertebralardan girilerek spinöz prosesin eksizyonunu takiben kemikte deliğin açılması

Dura ortaya konarak epidural anestezi yönteminden farklı olarak sivri uçlu forseps ile beyin omirilik sıvısı sızana kadar yırtık açıldı. Dura içinden spinal anestezi için kannulasyon amacıyla polietilen tüp (P.E.; i.d. 0.28 mm ve o.d 061 mm, Becton Dickinson, Philedelphia, USA) servikal yönde yaklaşık 10-15 mm ilerletildi ve 4.0 poliglaktin (Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) dikiş ile proksimaldeki spinöz prosese fikse edildi (Şekil 19).



Şekil 19: Duranın yırtılıp dura altından polietilen tüpün yerleştirilmesi

Polietilen tüpün diğer ucu cilt altından künt keskin disseksiyonla tünel oluşturulup kulak arkasından çıkartıldı. Epidural anestezi modelinde olduğu gibi kateter yerleştirilmesi ve fiksasyonunu takiben vertebral kemikte açılan delik fibrin matriks (TISSEEL) ile kapatıldı. Paravertebral kaslar ve paravertebral fasya 5.0 poliglaktin (Vicryl, Ethicon, Johnson&Johnson, Norderstedt, Germany) dikiş ile primer suture edilerek kapatıldı.

3.5. Biyokimyasal Ölçümler

3.5.1. Malondialdehit (MDA) doku düzeyi ölçümü

Lipid peroksidasyonun son ürünlerinden biri olan malondialdehitin doku düzeyinin belirlenmesinde Buege-Aust yöntemi tercih edildi (143,144). Kas dokuları Ultra Turrax ile homojenize edildi ve 0.15 M KCl çözeltisi ile %10'luk homojenatlar hazırlandı. %10'luk kas homojenatından 250 ml alındı. Üzerine 750 ml distile su ve 2 ml Buege ayracı eklendi, karıştırıldı ve 15 dakika kaynar su banyosunda bekletildi,

soğutuldu ve santrifüj edildi. Absorbanslar, homojenat içermeyen bir ayıraç körüne karşı 532 nm’de spektrofotometrede okundu. Malondialdehit düzeyleri MDA’nın molar ekstinksiyon katsayısı ($\epsilon = 1.56 \times 10^5 M^{-1} \text{ cm}^{-1}$) kullanılarak hesaplandı ve sonuçlar nmol MDA/gr yaş doku cinsinden tanımlandı.

Buege ayracı : %0.67 TBA + 7.5 ml TCA + 1.05 ml derişik HCl + 5 mg BHT / 50 ml H₂O

3.5.2. Paraoksonaz (PON 1) doku düzeyi ölçümü

Paraoksonaz enzimi insan 7q21-22 kromozomundan kodlanmaktadır. Karaciğer, dalak, ince bağırsak gibi organlarda ve serumda yaygın bir dağılım göstermektedir. Paraoksonazın bilinen üç tipi bulunmaktadır. PON 1 paraoksonaz, arilesteraz, homosistein tiolaktonaz (HTLaz) aktivitelerini gösterirken, PON 2 ve PON 3 sadece HTLaz aktivitesi göstermektedir. PON1’in, LDL’nin hücre kaynaklı oksidasyonuna karşı koruyucu olduğu gösterilmiştir. PON 1’in bunu nasıl yaptığının mekanizması tam olarak açıklanamamasına rağmen çalışmalarda HDL bağımlı PON 1’in yalnız LDL oksidasyonunu değil, aynı zamanda HDL oksidasyonunu da engellediği gösterilmiştir. Bu etki PON 1’in lipoprotein aracılı peroksitleri hidroliz edebilme özelliğine bağlıdır. PON 1 lipoprotein kaynaklı fosfolipid peroksitlerinde ve kolesterol ester peroksitlerinde bulunan O ve P arasındaki ester bağına hidroliz edebildiği gösterilmiştir. Paraoksonazın fosfatidilkolinleri hidroliz etme kapasitesi, okside LDL’deki kolesterol linoleat hidroperoksitleri ve hidroksitleri indirgemesi nedeni ile peroksidaz benzeri aktivitesi olduğu bildirilmiştir. LDL üzerine PON 1’in antioksidan etkisi endotel hücrelerine monosit adezyonunu ve okside fosfolipidlere bağlanan makrofaj kemotaksisini azalttığı bildirilmiştir. Yapılan çalışmalarda Paraoksonaz düzeyi ile oksidatif stres arasında karşılıklı bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür (145, 146).

Paraoksonaz enziminin substratı olan paraoksonu hidrolizi sonucu oluşan p-nitrofenolün dakikada oluşturduğu absorbans artışının 25°C’ lik ortam ısısında ve 405 nm’de spektrofotometrik olarak ölçümü ile enzim aktivitesi saptanır. Kas doku

örnekleri eritildikten sonra 10 µL serum içerisinde 2mM CaCl₂ ve 1 mM paraokson bulunan 50 mM Tris-HCl asit tamponu (PH:8) ile 1 ml' ye tamamlanıp homojenize edildi ve homojenatlar 10.000 × g'de 15 dakika süreyle santrifüje edildi. Sonra süpernatantlar PON ölçümlerine mani olan tip B esterazları engellemek için 10 µM paraokson varlığında 15 dakika süreyle inkübe edildi. Köre sadece 1 mM CaCl₂ ve 1 mM paraokson bulunan Tris-HCl asit tamponu (PH:8, 50 mM) kondu. P-nitrofenolün meydana getirdiği absorbans artışı 30 sn aralarla 25°C' lik ortam ısısında ve 405 nm' de kaydedildi. P-nitrofenol miktarı, 17000 M⁻¹ cm⁻¹ (PH:8) molar ekstinksiyon katsayısı kullanılarak hesaplandı. 1 ünite paraoksonaz aktivitesi 1 dakikada 1 nmol p-nitrofenol oluşturuldu. Paraoksonaz aktivitesi U/L gr yaş doku olarak verildi.

3.5.3. Nitrik oksit (NO) doku düzeyi ölçümü

Nitrik Oksit, nitrit oksit sentetaz (NOS) enzimi tarafından biyolojik sistemlerde sentezlenir. İn vivo ortamlarda nitrit oksidin son ürünleri nitrit ve nitrattır. Nitrit ve nitratin kısmi oranları değişkendir ve kesinlik göstermez. Bu nedenle total nitrik oksidin en iyi indeksi hem nitritin hem de nitratin toplamı olarak ifade edilir. NO kitleri iki basamaklı bir yöntemle total nitrit / nitrat ölçümlerini sağlayan doğru ve kullanışlı bir metot sunmaktadır (147).

Nonspesifik reaksiyonların önüne geçebilmek amacıyla numuneler önce deproteinize edilip daha sonra total nitrit (nitrit ve nitrat) seviyeleri ölçüldü. NO analizi Griess reaksiyonu ile belirlendi. Total nitrit (nitrit + nitrat) konsantrasyonu modifiye kadmiyum redüksiyon metodu ile değerlendirilerek reaksiyon sonu oluşan pembe rengin 545 nm dalga boyunda spektrofotometrede okunması ile sonuçlar mikromol/L gr yaş doku olarak belirlendi.

3.5.4. Total antioksidan kapasite (TAK) doku düzeyi ölçümü

Total antioksidan kapasite Erel yöntemi ile ölçüldü (148). Bu ölçüm yönteminde 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolin-6- sülfonik asit) radikali (ABTS radikali) kullanılmaktadır. ABTS radikali, antioksidan konsantrasyonuna ve antioksidan

kapasiteye göre mavi ve yeşil rengini kaybetmektedir. Bu renk değişikliği, absorbans değeri 660 nm’de ölçülerek değerlendirme yapılmaktadır. Bu ölçüm metodunun prensibi hidrojen peroksit varlığında ABTS molekülünün $ABTS^+$ molekülüne okside olmasına dayanmaktadır. 30 mmol/L asetat tamponu ve pH: 3.6’da koyu yeşil renkte olan radikalin, asetat tamponu 0.4 mol/L, pH: 5.8 olduğunda rengi açılmaktadır. Renk değişimi ile örnek içindeki antioksidan miktarı arasında ters ilişki bulunmaktadır. Reaksiyon hızı standart yöntem olan Trolox ile kalibre edilmektedir. Sonuçlar trolox equiv./L olarak belirlendi.

Öncelikle reaktifler hazırlandı. Birinci reaktif 32,8 gr CH_3COONa ’nın 1000 ml distile su içinde eritilmesi ile 0.4 mol/L asetat tampon solüsyonu (pH: 5.8 olacak şekilde) oluşturuldu. 22.8 ml asetik asit, 1000 ml su ile seyreltilerek, 0.4 mol/L konsantrasyona getirildi. 940 ml sodyum asetat solüsyonu ile 60 ml asetik asit solüsyonu karıştırıldı. İkinci reaktif ise 2.46 gr CH_3COONa , 1000 ml distile suda eritilerek 30 mmol/L asetat tampon solüsyonu (pH: 3.6) hazırlandı. 1.705 ml Asetik asit 1000 ml distile su ile seyreltilerek, 30 mmol/L konsantrasyonda karışım elde edildi. 75 ml sodyum asetat solüsyonu, 925 ml asetik asit solüsyonu ile karıştırıldı. pH:3.6 olacak şekilde ayarlandı. Sonra 278 µl H_2O_2 solüsyonu, 1000 ml tampon solüsyonu ile seyreltilerek 2 mmol/L konsantrasyona getirildi. Daha sonra 0.549 gr ABTS radikali, 100 ml hazırlanan solüsyonda eritilerek 10 mmol/L konsantrasyona getirildi. Bir saat oda ısısında bekletildi ve karakteristik ABTS renginin oluşması sağlandı. Spektrofotometrik ayarlardan sonra Aeroset otomatik analizatöre (Abott Aeroset® C8000™ cihazına) uygulandı. Ölçüm formatı tablo 3’de verilmiştir.

Tablo 3: Total antioksidan kapasite (TAK) ölçüm formatı

1. Reaktif volümü	200 µl (asetat tamponu 0,4 mmol/L, pH 5,8)
Örnek volümü	5 µl (serum ya da diğer sıvılar, saf antioksidan solüsyonu)
2. reaktif volümü	20 µl (2. radikal: 30 mmol/L, pH 3,6 içinde ABTS)

Dalga boyu	660 nm (ya da 420 ve 740 nm aralığı)
Değerlendirme	İlk ölçüm R1 ile R2 karışımı anında ve son ölçüm karıştırılmadan 5 dakika sonra
Kalibrasyon şekli	Doğrusal

3.5.5. Total oksidatif stres (TOS) doku düzeyi ölçümü

Erel tarafından geliştirilen tam otomatik kalorimetrik bir yöntemdir (147). 140 mM'lık NaCl çözeltisi içerisine 25 mM H₂SO₄ çözülerek ana solüsyon hazırlandı. Birinci reaktifte ana solüsyonda önce % 10 oranında gliserol çözülüp daha sonra total volümde 250 µM Xlenol orange çözülerek hazırlandı. Ana solüsyon içerisine önce 10 mM o-Dianisidine dihydrochloride çözülüp sonra 5 mM amonyom ferröz sülfat çözülerek ikinci reaktif hazırlandı. Örnekte bulunan oksidanlar ferröz iyon-o-dianisidine kompleksini ferrik iyonla oksitlerler. Ortamda bulunan gliserol bu reaksiyonu hızlandırarak yaklaşık üç katına çıkarmaktadır. Ferrik iyonlar asidik ortamda xlenol orange ile renkli bir kompleks oluştururlar. Örnekte bulunan oksidanların miktarıyla ilişkili olan rengin şiddeti spektrofotometrik olarak ölçüldü. Sonuçlar µmol H₂O₂ Eqv. / L olarak belirlendi.

3.6. Histopatolojik Değerlendirme

Patolojik değerlendirme için alınan doku biyopsi örnekleri % 10'luk formaldehit solüsyonuna alınarak 72 saat tespit için bekletildikten sonra rutin histopatolojik takipten geçirilerek H&E boyasıyla boyanıp belirli bir uzman patolog tarafından değerlendirildi.

Alınan doku örnekleri, oda ısısında, %10'luk formalin solüsyonu içerisinde 72 saat tespit edildi. Tespit edilen dokular standart doku takip yönteminden geçirilerek hazırlanan parafin bloklardan mikrotomla lamlara 5 µm kalınlığında kesitler alındı. Her denekten alınan 10 adet seri kesit histopatolojik değerlendirmenin yapılabilmesi amacıyla hematoxilen-eozin ile boyandı. Dejeneratif bulguların değerlendirilmesi ardarda alınan seri kesitlerde, her kesitten gelişigüzel seçilen 5 ayrı alanda, her bir alan için 50 büyük büyütme alanında yapıldı. Her bulgu için verilen puanlar istatistiksel olarak değerlendirildi. Değerlendirmenin yapılabilmesi için kesitler deparafinizasyon amacıyla bir gece 37 °C ve ertesi gün 1 saat 60 °C olacak şekilde etüvde bekletilerek 15'X2 ksilole etkin bırakıldı. Dehidrate edilmesi amacıyla dokular 10'ar dakika olacak şekilde sırasıyla %100, %96 ve %80'lik alkol serilerinden geçirildi. Dehidrate edilen dokular alkolden arındırılmak için 5X2 kez distile sudan geçirildikten sonra, doku içerisinde formaldehitin kapattığı reseptör bölgelerinin açığa çıkarılmasını sağlamak için 1µ sitrat tamponu ile mikrodalga fırında, 650 watta 5 dakika, 550 watta 5'X3 kez retriver işleminden geçirildi. 20 dakika oda ısısında soğumaya bırakılan kesitler, 5 dakika distile suda yıkandıktan sonra pap pen ile kesit üzerindeki dokuların etrafı çizilip daha sonra, 15 dakika % 3' lük hidrojen peroksit ile etkin bırakılan dokularda endojen peroksidaz aktivitesi bloke edildi. İşlem sonrasında PBS (Phosphate buffer saline, pH=7,4) ile camlar yıkandı ve yıkanan camlara 5 dakika Ultra V blok uygulanarak özgün olmayan bağlanmaların engellenmesi sağlandı. Bu işlemten sonra dokular yıkanmadan primer antikor aşamasına geçildi. Bu amaçla kesitlere caspas 3 (CPP32) Ab4 primer antikoru damlatılarak 30 dakika oda ısısında bekletildi. Daha sonra PBS ile yıkanan camlara 20 dakika biyotinli sekonder antikor uygulanarak primer antikora bağlanması sağlandı. PBS ile yıkanan camlar 20 dakika streptavidin peroksidaz enzim kompleksinde etkin bırakılıp, böylece camlarda enzimin biyotine bağlanması sağlandı. Son olarak AEC (3 – amino – 9 – ethylcarbazine) eklenerek yaklaşık 10 dakika bekletilip, gözle görülebilir ürünün ortaya çıkması sağlandı. Zemin boyası olarak Mayer'in Hemotoksilen'i kullanıldı. Bu şekilde boyanan camlar ışık mikroskopta değerlendirildi. Oluşturulan kesitlerde 200'lük büyütmede polimorf nüveli hücre infiltrasyonu, kas liflerinde nekroz beş farklı alanda ölçülerek ortalaması alınıp enflamasyon bulguları minimal, negatif ve pozitif olarak kategorize

edildi. Buna ek olarak 200'lük büyütmelerde beş farklı alanda ölçülüp ortalaması alınarak hyalinizasyon “%” olarak ve nükleer değişiklikler hafif (+), orta (+ +), şiddetli (+ + +) olarak değerlendirildi (148).

3.7. İstatiksel Değerlendirme

Çalışmada elde edilen bulgular değerlendirilirken, istatistiksel analizler için NCSS (Number Cruncher Statistical System) 2007&PASS 2008 Statistical Software (Utah, USA) programı kullanıldı. Çalışma verileri değerlendirilirken tanımlayıcı istatistiksel metodların (Ortalama, Standart sapma) yanı sıra niceliksel verilerin karşılaştırılmasında normal dağılım gösteren parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Oneway Anova testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Tukey HSD testi kullanıldı. Normal dağılım göstermeyen parametrelerin gruplar arası karşılaştırmalarında Kruskal Wallis testi ve farklılığa neden çıkan grubun tespitinde Mann Whitney U test kullanıldı. Niteliksel verilerin karşılaştırılmasında ise Ki-Kare testi kullanıldı. Anlamlılık $p < 0.05$ düzeyinde değerlendirildi.

4. BULGULAR

Takip döneminde bölgesel anestezi amacıyla laminektomi prosedürü yapılan 3 sıçanda nörolojik defisit gelişmesi nedeniyle çalışma dışında tutuldu. Diğer tüm sıçanlar normal ve problemsiz şekilde iyileşti. Araştırmacılar bulgularını yorumlarken deney gruplarını bilmeksizin çift-kör olarak değerlendirildi

4.1. Biyokimyasal Bulgular

4.1.1. Malondialdehit (MDA) sonuçları

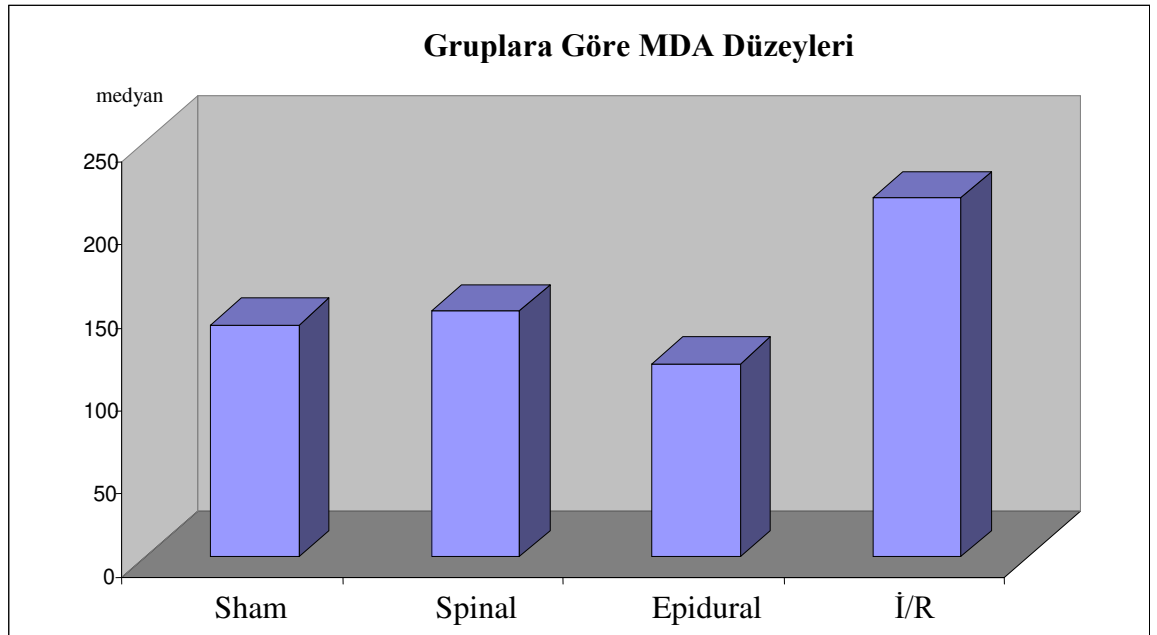
Gruplara göre MDA düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.05$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; İ/R grubunun MDA düzeylerinin sham grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p:0.001$). Epidural grubunun MDA düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı şekilde düşük olduğu saptandı (0.037). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 4: Gruplarda MDA düzeyleri

	Sham Grubu (n=10) (nmol/gr doku)	Spinal Grubu (n=10) (nmol/gr doku)	Epidural Grubu (n=10) (nmol/gr doku)	İ/R Grubu (n=10) (nmol/gr doku)
1	122.32	145.18	96.16	237.58
2	182.71	176.70	98.42	165.00
3	216.41	244.11	246.53	247.55
4	76.93	115.40	115.40	192.40
5	108.60	293.31	118.14	195.29
6	141.77	112.71	82.37	172.18
7	133.62	151.46	298.99	257.90
8	149.02	119.83	239.41	162.47
9	146.20	291.00	177.00	248.11
10	138.48	114.73	96.78	258.25

Tablo 5: Gruplara göre MDA değeri

Grup	MDA	
	Ort±SS (medyan)	Min-Max
Sham	141.60±38.12 (140.12)	76.93-216.41
Spinal	176.44±72.85 (148.32)	112.71-293.31
Epidural	156.92±78.13(116.77)	82.37-298.99
İ/R	213.67±39.93 (216.43)	162.47-258.25
P	0.035*	
Sham-Spinal	0.450	
Sham-Epidural	0.762	
Sham-İ/R	0.001**	
Spinal-Epidural	0.345	
Spinal-İ/R	0.112	
Epidural-İ/R	0.037*	
Kruskal Wallis test kullanıldı	*p<0.05	**p<0.01



Şekil 20: Gruplara göre MDA düzeyleri

4.1.2. Paraoksonaz (PON) sonuçları

Gruplara göre PON düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Mann Whitney U test sonucunda; epidural grubunun PON düzeylerinin İ/R grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p:0.028$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

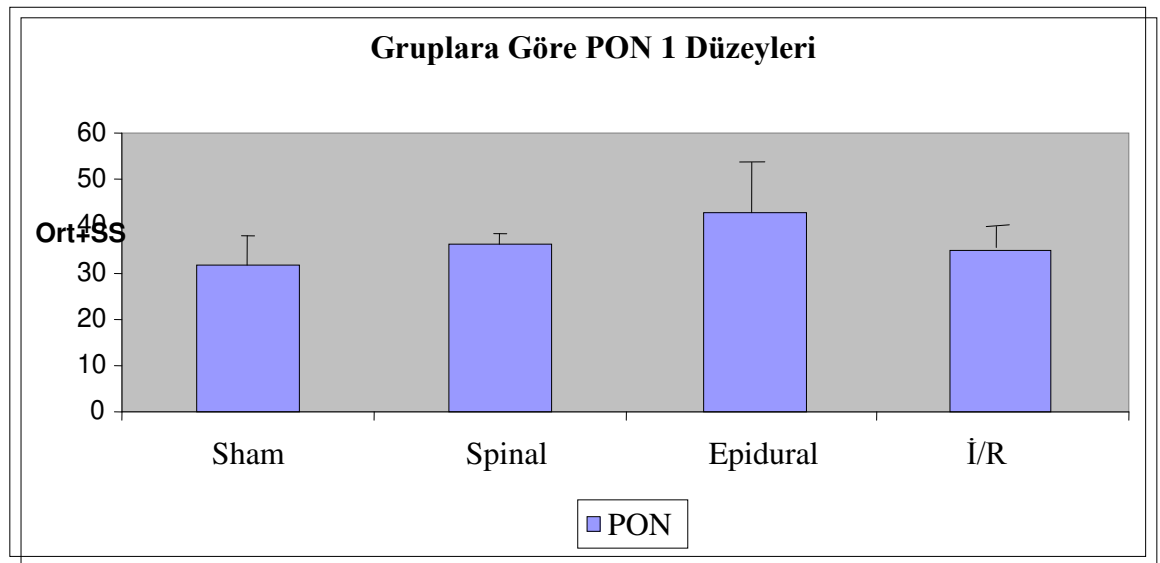
Tablo 6: Gruplarda PON 1 düzeyleri

	Sham Grubu (n=10) (U/L gr doku)	Spinal Grubu (n=10) (U/L gr doku)	Epidural Grubu (n=10) (U/L gr doku)	İ/R Grubu (n=10) (U/L gr doku)
1	41.86	34.19	38.09	39.65
2	41.34	33.81	36.92	22.36
3	33.54	33.02	34.71	35.75
4	33.02	34.71	62.66	37.44
5	36.92	37.53	59.67	27.30
6	31.85	37.71	31.85	32.89
7	32.50	36.40	39.13	35.23
8	33.54	34.06	49.79	36.40
9	28.60	38.09	41.34	26.40
10	35.75	40.82	32.5	20.67

Tablo 7: Gruplara göre PON 1 değeri

Grup	PON 1	
	Ort±SS	Min-Max
Sham	34.89±4.17 (33.5)	28.60-41.86
Spinal	36.03±2.48 (35.5)	33.02-40.82
Epidural	42.66±11.01(38.6)	31.85-62.66
İ/R	31.41±6.70 (34.1)	20.67-39.65
P	0.045*	
Sham-Spinal	0.212	
Sham-İ/R	0.384	
Sham-Epidural	0.096	
Spinal-İ/R	0.140	
Spinal-Epidural	0.173	
Epidural-İ/R	0.028*	

Oneway ANOVA test kullanıldı **p<0.01



Şekil 21: Gruplara göre PON düzeyleri

4.1.3. Nitrik oksit (NO) sonuçları

Gruplara göre Nitrik oksit düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 8: Gruplarda NO düzeyleri

	Sham Grubu (n=10) ($\mu\text{mol/L}$ gr doku)	Spinal Grubu (n=10) ($\mu\text{mol/L}$ gr doku)	Epidural Grubu (n=10) ($\mu\text{mol/L}$ gr doku)	İ/R Grubu (n=10) ($\mu\text{mol/L}$ gr doku)
1	5.33	5.72	12.74	13.13
2	11.63	6.76	14.03	6.65
3	9.69	17.16	10.11	5.85
4	12.80	10.14	15.47	6.37
5	11.57	33.67	6.32	87.75
6	15.99	10.01	4.29	33.28
7	9.84	28.8	11.31	15.7
8	7.72	24.57	7.02	31.98
9	8.67	6.37	33.28	7.28
10	12.7	7.15	16.64	5.07

Tablo 9: Gruplara göre Nitrik oksit değerlendirmesi

Grup	Nitrik oksit	
	Ort $\pm$ SS (Medyan)	Min-Max
Sham	10.59 $\pm$ 3.01 (10.71)	5.33-15.99
Spinal	15.03 $\pm$ 10.40 (10.07)	5.72-33.67
Epidural	13.12 $\pm$ 8.16 (12.02)	4.29-33.28
İ/R	21.31 $\pm$ 25.62 (10.20)	5.07-87.75
P	0.977	

Kruskal Wallis test kullanıldı

4.1.4. Total antioksidan kapasite (TAK) sonuçları

Gruplara göre total antioksidan kapasite düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan ikili karşılaştırmalar sonucunda; epidural grubunun total antioksidan kapasite düzeylerinin sham, spinal ve İ/R gruplarından anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p:0.001$; $p:0.001$; $p:0.001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

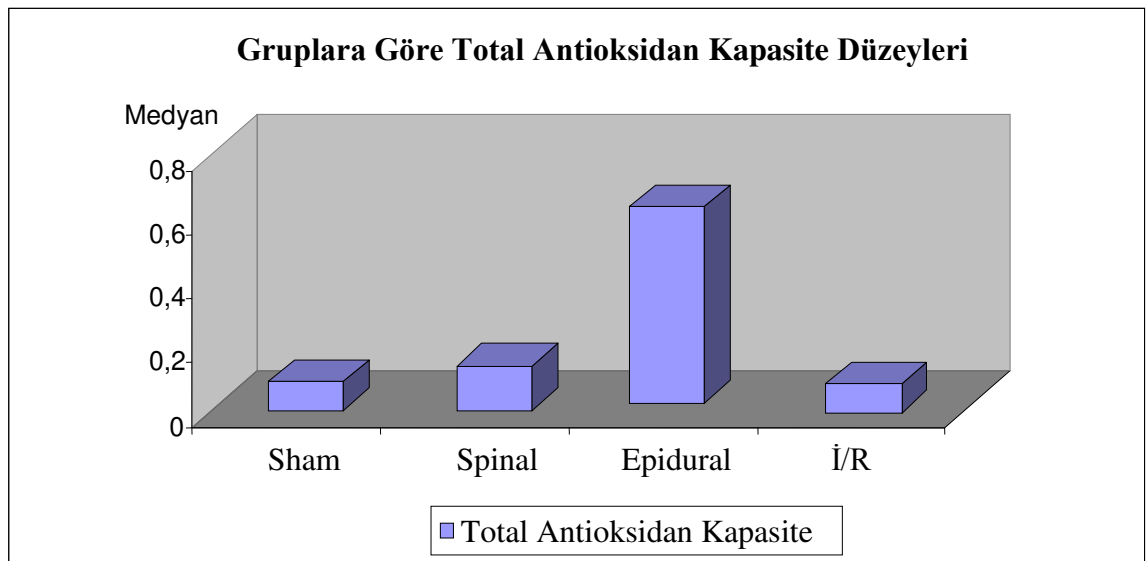
Tablo 10: Gruplarda TAK düzeyleri

	Sham Grubu (n=10) (mmol Trolox Equiv./L gr doku)	Spinal Grubu (n=10) (mmol Trolox Equiv./L gr doku)	Epidural Grubu (n=10) (mmol Trolox Equiv. /L gr doku)	İ/R Grubu (n=10) (mmol Trolox Equiv./L gr doku)
1	0.086	0.216	0.964	0.148
2	0.157	0.201	0.387	0.104
3	0.097	0.146	0.626	0.07
4	0.077	0.076	0.376	0.105
5	0.058	0.118	0.163	0.171
6	0.122	0.13	0.555	0.083
7	0.125	0.159	0.742	0.171
8	0.164	0.154	1.105	0.056
9	0.054	0.121	0.779	0.092
10	0.051	0.077	0.589	0.061

Tablo 11: Gruplara göre total antioksidan kapasite değerlendirmesi

Grup	Total Antioksidan Kapasite
------	----------------------------

	Ort±SS (Medyan)	Min-Max
Sham	0.09±0.04 (0.09)	0.05-0.16
Spinal	0.14±0.04 (0.14)	0.07-0.22
Epidural	0.63±0.28 (0.61)	0.16-1.11
İ/R	0.11±0.04 (0.09)	0.05±0.17
P	0.001**	
Sham-Spinal	0.104	
Sham-İ/R	0.597	
Sham-Epidural	0.001**	
Spinal-İ/R	0.130	
Spinal-Epidural	0.001**	
İ/R-Epidural	0.001**	
Kruskal Wallis test kullanıldı **p<0.01		



Şekil 22: Gruplara göre total antioksidan kapasite düzeyleri

4.1.5. Total oksidatif stres (TOS) sonuçları

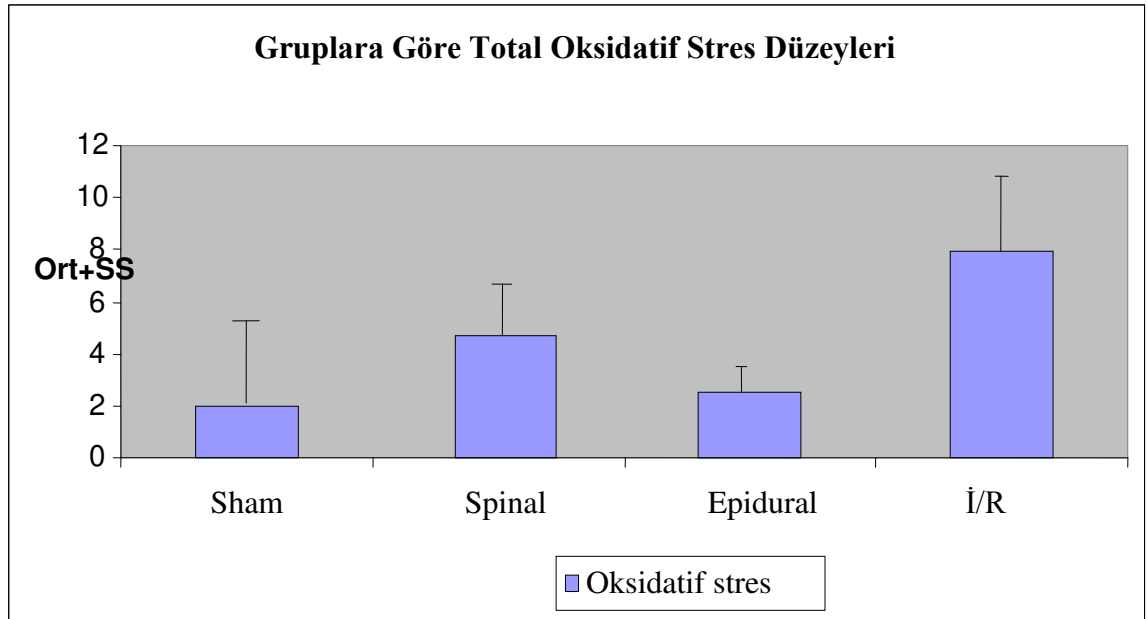
Gruplara göre Total oksidatif stres düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Post-Hoc Tukey HSD test sonucunda; Spinal grubunun oksidatif stres düzeylerinin epidural grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu ($p:0.045$), İ/R grubunun oksidatif stres düzeylerinin epidural grubundan anlamlı şekilde yüksek olduğu saptanmıştır ($p:0.001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

Tablo 12: Gruplarda TOS düzeyleri

	Sham Grubu (n=10) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L gr doku)	Spinal Grubu (n=10) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L gr doku)	Epidural Grubu (n=10) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L gr doku)	İ/R Grubu (n=10) ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ Equiv./L gr doku)
1	5.99	3.45	2.71	11.12
2	3.74	7.15	2.43	5.29
3	3.35	4.13	3.25	7.93
4	4.30	5.53	2.31	7.91
5	3.24	2.57	5.12	5.34
6	5.08	1.6	3.79	8.3
7	3.98	5.73	8.34	6.13
8	5.10	8.54	2.49	8.55
9	5.22	8.83	5.16	9.09
10	4.42	11.73	1.34	9.41

Tablo 13: Gruplara göre total oksidatif stres değerlendirmesi

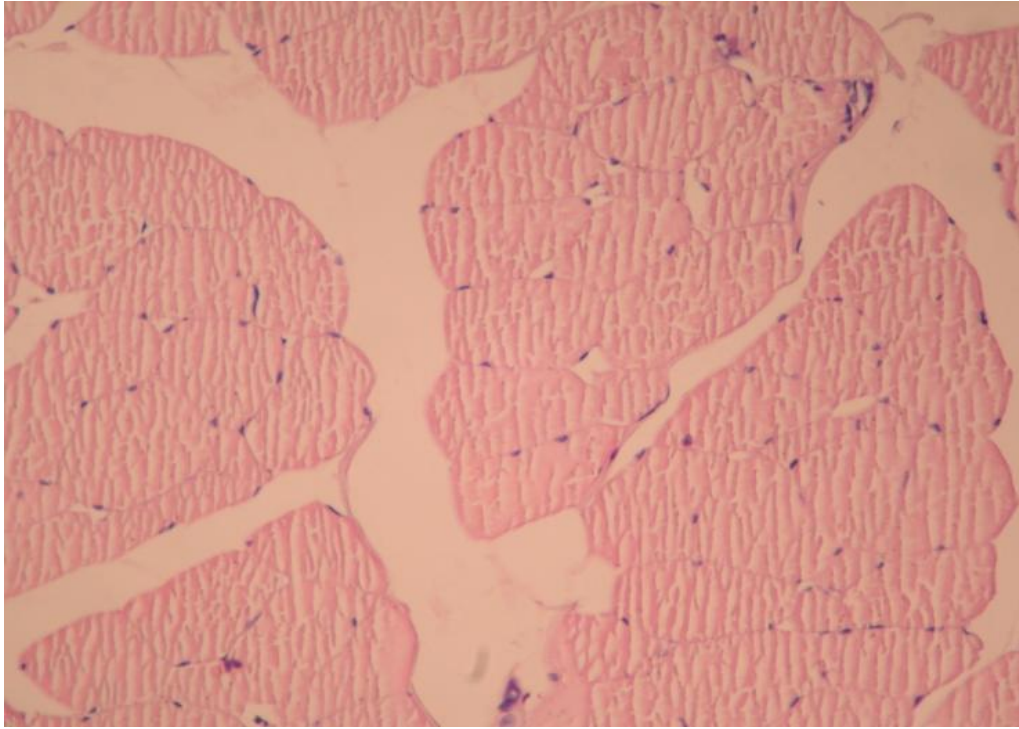
Grup	Oksidatif Stres	
	Ort±SS	Min-Max
Sham	4.44±0.69	1.74-3.30
Spinal	5.92±3.16	1.60-11.73
Epidural	3.69±2.03	1.34-8.34
İ/R	7.70±1.55	5.29-11.12
<i>p</i>	0.001**	
Sham-Spinal	0.247	
Sham-Epidural	0.104	
Sham-İ/R	0.06	
Spinal-Epidural	0.045*	
Spinal-İ/R	0.242	
Epidural-İ/R	0.001**	
Oneway ANOVA test kullanıldı	*<0.05	**p<0.01



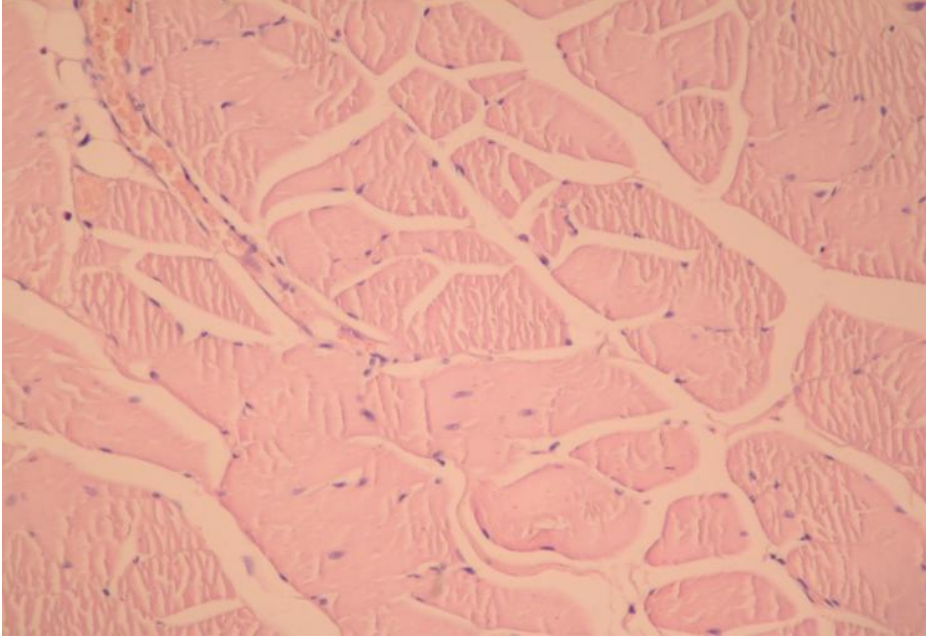
Şekil 23: Gruplara göre total oksidatif stres düzeyleri

4.2. Histopatolojik Çalışma

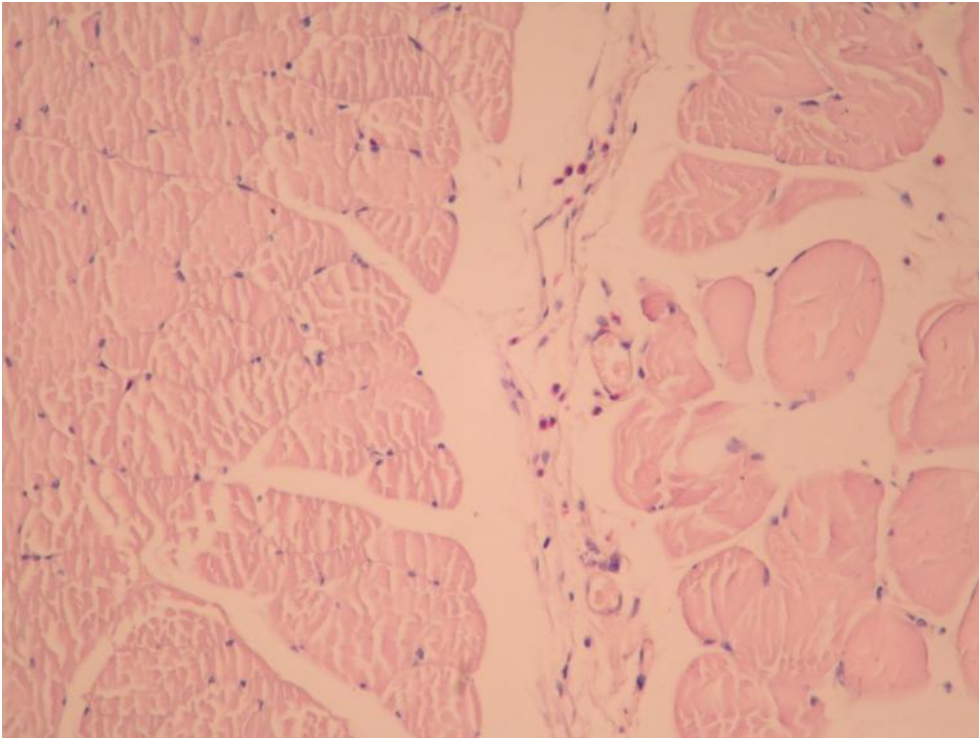
Hematoksilen eozinle (H&E) boyanmış kesitlerde 200'lük büyütmede hyalinizasyon, nükleer değişiklikler, enflamasyon bulguları değerlendirildi. Beş farklı alanda ölçülen değerlerin ortalaması alındı. İskemi reperfüzyon yapılmayan sham grubunda hyalinizasyon, nükleer göç ve enflamasyon bulguları gözlenmemiş olup normal yapıda çizgili kas dokusu görünümü dikkat çekmektedir (Şekil 24). İ/R grubunda bazı kas liflerinde merkeze nükleer göç, hyalinizasyon ve enflamasyon dikkat çekerken spinal anestezi grubunda kas liflerinde grubunda merkeze nükleer göç, hyalinizasyon ve enflamasyon bulgularının belirgin olduğu gözlenmiştir (Şekil 25-26-27-28). Epidural anestezi grubunda kas liflerinde nükleer değişiklikler belirgin olmamakla birlikte, hyalinizasyon ve enflamasyon bulguları gözlenmiştir (Şekil 29).



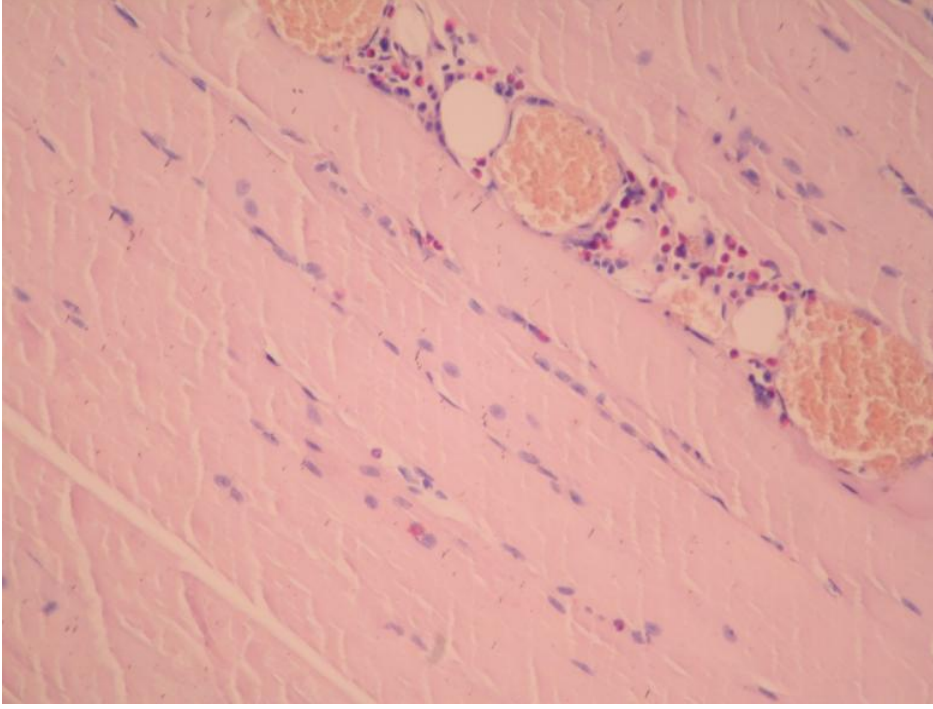
Şekil 24: Sham grubunda çizgili kas dokusu örneklerinin normal yapıda olduğu dikkat çekmektedir (H&E boyama, ×200).



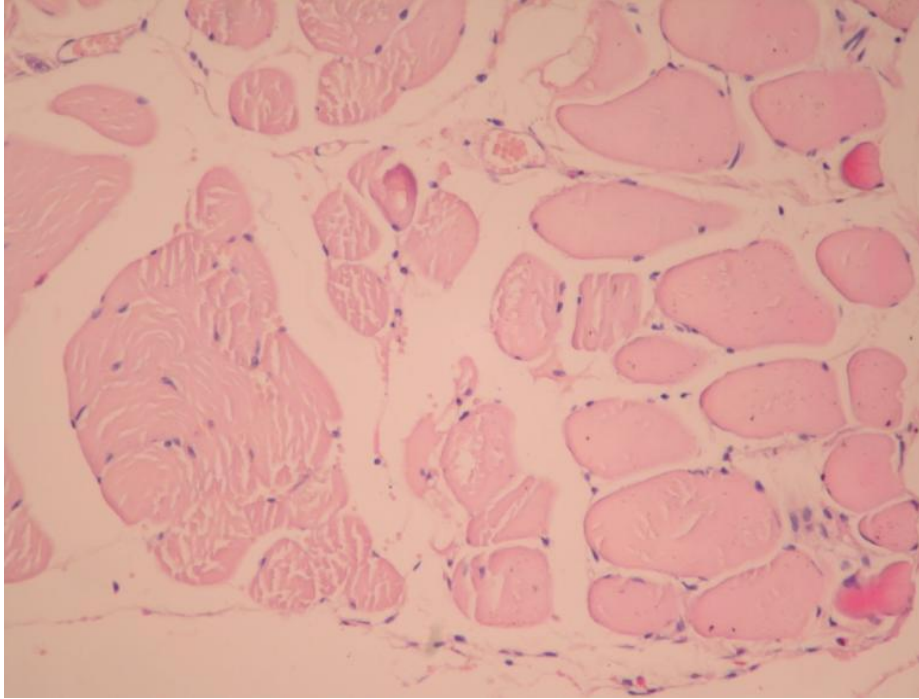
Şekil 25: İ/R grubunda bazı kas liflerinde merkeze nükleer göç ve hyalinizasyon izlenmektedir(H&E boyama, ×200).



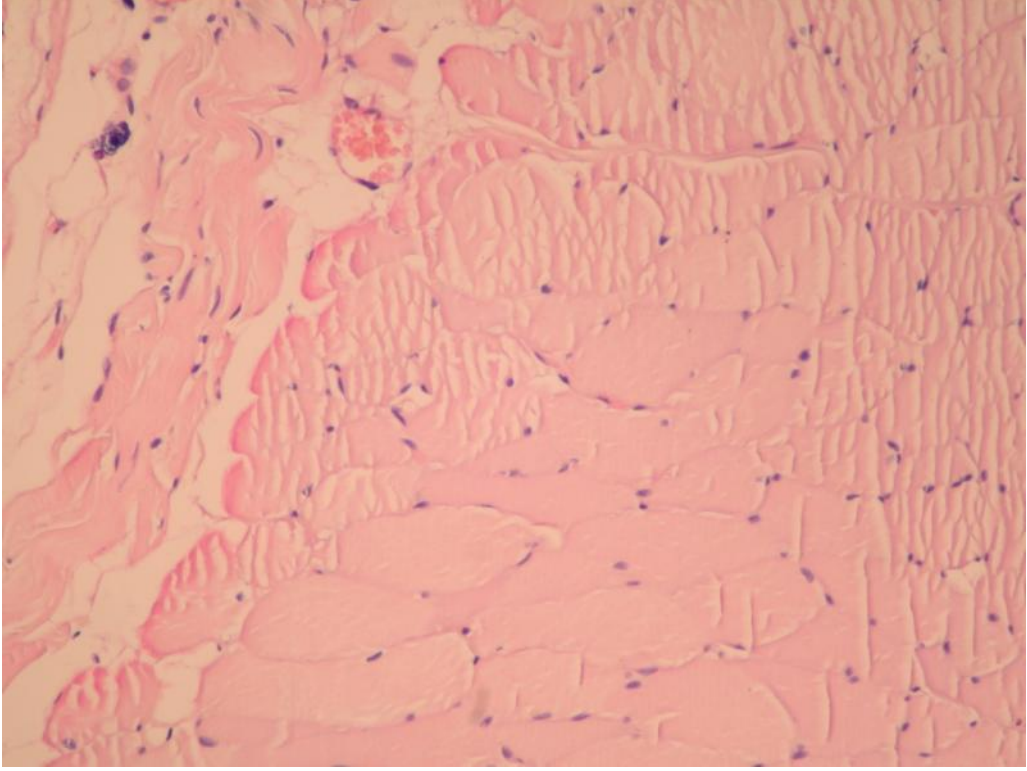
Şekil 26: İ/R grubunda dokularda enflamasyon ve hyalinizasyon izlenmektedir (H&E boyama, ×200)



Şekil 27: Spinal anestezi grubunda bazı kas liflerinde dejenerasyon ile enflamasyon ve merkeze nükleer göçün belirgin olduğu dikkat çekmektedir (H&E boyama, ×200)



Şekil 28: Spinal anestezi grubunda kas liflerinde düzensizlikle hyalinize globüler değişiklikler izlenmektedir (H&E boyama, ×200)



Şekil 29: Epidural anestezi grubunda dokularda enflamasyon ve hyalinizasyon izlenmektedir (H&E boyama, ×200).

4.2.1. Enflamasyon sonuçları

Gruplara göre enflamasyon durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$); Sham grubunda enflamasyon görülme oranı diğer gruplardan yüksekken, Spinal ve Epidural gruplarda minimum enflamasyon oranı diğer gruplardan anlamlı yüksektir. Spinal grubunda minimal enflamasyon oranı epidural grubundan daha yüksektir.

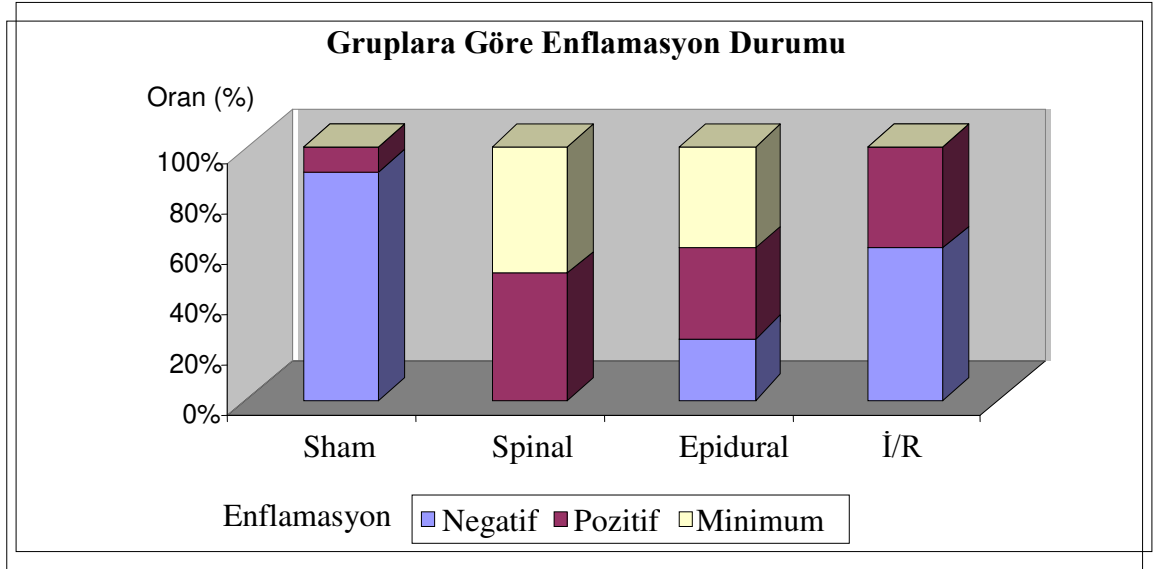
Tablo 14: Gruplarda enflamasyon bulguları sonuçları

	Sham Grubu (n=10)	Spinal Grubu (n=10)	Epidural Grubu (n=10)	İ/R Grubu (n=10)
1	—	Minimal	+	—
2	—	+	—	+
3	—	+	Minimal	+
4	—	Minimal	+	—
5	—	+	+	+
6	—	Minimal	Minimal	—
7	—	+	+	+
8	—	+	Minimal	—
9	—	Minimal	+	—
10	—	Minimal	Minimal	—

Tablo 15: Gruplara göre enflamasyon değerlendirilmesi

Enflamasyon	Sham	Spinal	Epidural	İ/R	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)	
Negatif (—)	9 (%90)	0 (%0)	1 (%10)	6 (%60)	
Pozitif (+)	1 (%10)	5 (%50)	5 (%50)	4 (%40)	0.001**
Minimum	0 (%0)	5 (%50)	4 (%40)	0 (%0)	

*Ki-Kare test kullanıldı****p<0.01*



Şekil 30: Gruplara göre enflamasyon dağılımı

4.2.2. Nükleer değişiklik oranları

Gruplara göre nükleer değişiklik durumları arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p < 0.01$); İ/R grubunda (+) oranı diğer gruplardan yüksekken, sham grubunda nükleer değişiklik görülme oranı diğer gruplardan anlamlı yüksektir. Spinal grubunda (++) nükleer değişiklik epidural grubundan daha fazladır. Yine spinal grubunda (+++) nükleer değişiklik oranı epidural grubundan anlamlı derecede fazladır.

Tablo 16: Gruplarda nükleer değişiklik sonuçları

	Sham Grubu (n=10)	Spinal Grubu (n=10)	Epidural Grubu (n=10)	İ/R Grubu (n=10)
1	+	++	++	++
2	0	++	++	++
3	0	++	+	+
4	0	+	++	+++
5	+	++	+	++

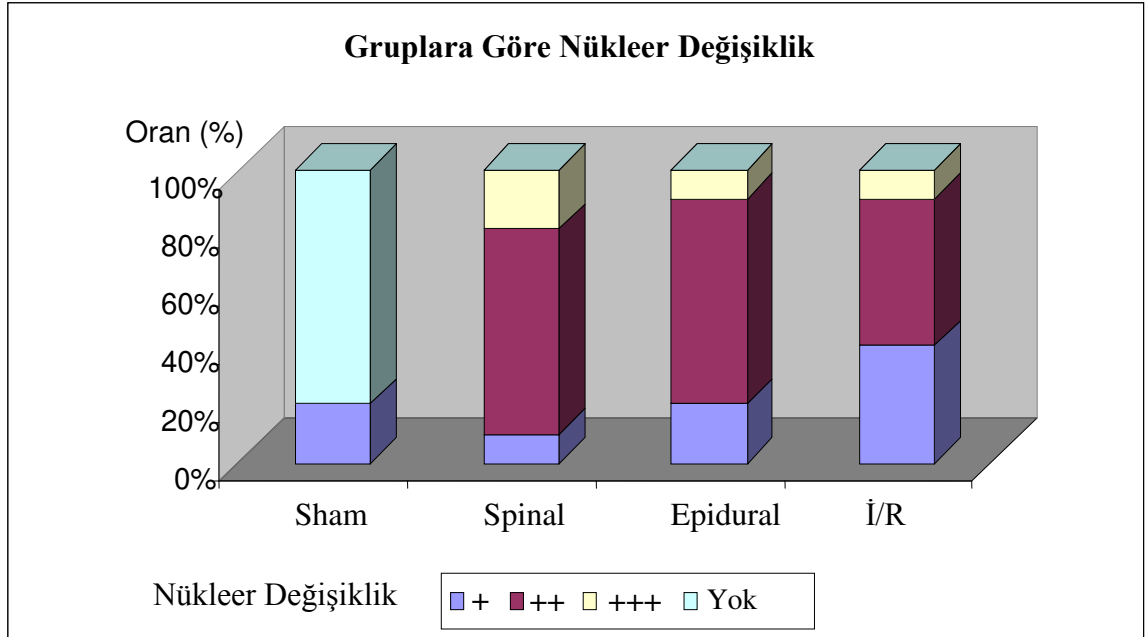
6	0	+++	+++	+
7	0	++	++	++
8	0	+++	++	++
9	0	++	++	+
10	0	++	++	+

Tablo 17: Gruplara göre nükleer değişiklik değerlendirilmesi

Nükleer Değişiklik	Sham n (%)	Spinal n (%)	Epidural n (%)	İ/R n (%)	p
+	2 (%20)	1 (%10)	2 (%20)	4 (%40)	0.001**
++	0 (%0)	7 (%70)	6 (%60)	5 (%50)	
+++	0 (%0)	2 (%20)	1 (%10)	1 (%10)	
Yok	8 (%80)	0 (%0)	0 (%0)	0 (%0)	

Ki-Kare test kullanıldı

**p<0.01



Şekil 31: Gruplara göre nükleer değişiklik dağılımı

4.3.3. Hyalinizasyon sonuçları

Gruplara göre Hyalinizasyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmaktadır ($p<0.01$). Farklılığın hangi gruptan kaynaklandığını saptamak amacıyla yapılan Post-Hoc Tukey HSD test sonucunda; sham grubunun hyalinizasyon düzeylerinin spinal, epidural ve İ/R gruplarından anlamlı şekilde düşük olduğu saptanmıştır ($p:0.001$; $p:0.001$; $p:0.001$). Diğer gruplar arasında istatistiksel olarak anlamlı farklılık bulunmamaktadır ($p>0.05$).

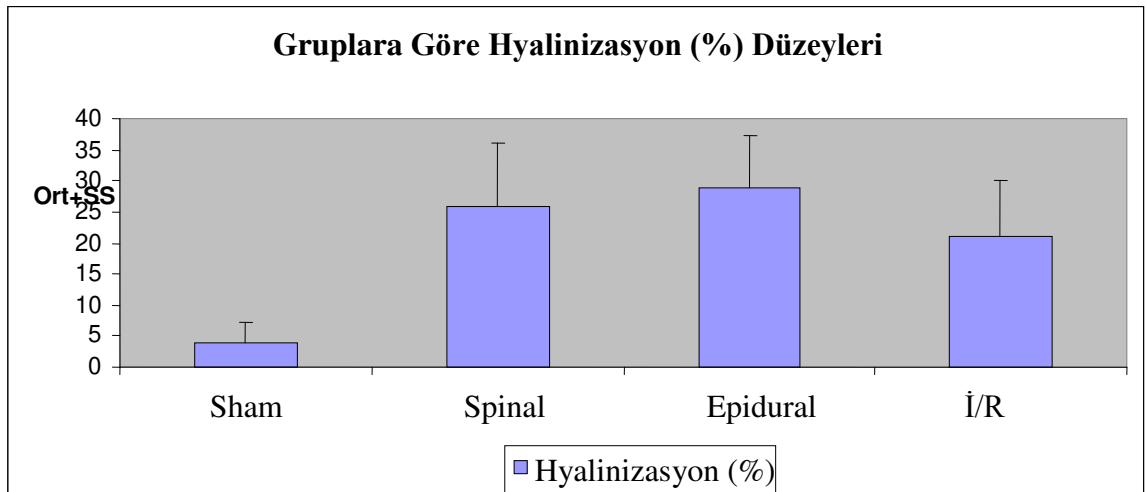
Tablo 18: Gruplarda hyalinizasyon sonuçları

	Sham Grubu (n=10)	Spinal Grubu (n=10)	Epidural Grubu (n=10)	İ/R Grubu (n=10)
1	% 5	% 15	% 25	% 20
2	% 5	% 25	% 20	% 40
3	% 0	% 20	% 15	% 25
4	% 5	% 10	% 35	% 30
5	% 0	% 35	% 25	% 20
6	% 10	% 30	% 40	% 15
7	% 0	% 25	% 35	% 20
8	% 5	% 45	% 40	% 10
9	% 5	% 25	% 30	% 10
10	% 5	% 30	% 25	% 20

Tablo 19: Gruplara göre hyalinizasyon değ erlendirmesi

Grup	Hyalinizasyon (%)	
	Ort±SS	Min-Max
Sham	4.0±3.16	0-10
Spinal	26.0±9.94	10-45
Epidural	29.0±8.43	15-40
İ/R	21.0±9.06	10-40
<i>P</i>	0.001**	
Sham-Spinal	0.001**	
Sham-Epidural	0.001**	
Sham-İ/R	0.001**	
Spinal-Epidural	0.841	
Spinal-İ/R	0.519	
Epidural-İ/R	0.140	

Oneway ANOVA test kullanıldı ***p<0.01*



Şekil 32: Gruplara göre hyalinizasyon dağılımı

5. TARTIŞMA

İskemide morfolojik ve fonksiyonel olarak kası da içeren pek çok dokuda mikrovasküler düzeyde değişiklikler meydana gelir. Reperfüzyon sırasında, kan elemanları ve iskemik doku arasındaki etkileşimler sonucunda hasarlar artar. İskemi sonrası dokularda enflamatuvar hücrelerin, özellikle nötrofil ve mast hücrelerinin reperfüzyon hasarında sorumlu olduklarının bulunması ile bu hücrelerin doku infiltrasyon ve aktivasyonlarının engellenmesi ile ilgili çalışmalar yapılmış ve doku hasarı azaltılabilmektedir. Serbest radikallerin etki mekanizmaları tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte en önemli etkilerinden biri lipid peroksidasyonu yoluyla hücre membranının hasarı olarak görünmektedir (1,2). Serbest radikaller ayrıca yaygın yangısal hasar oluşturabilirler ve doku hasarına yardım eden çeşitli yangısal mediyatörleri çekebilirler. Varolan tedavilerin her biri spesifik olayları inhibe ettiği için, aynı tedavide farklı hedeflere yönelerek birden fazla basamağı etkileyen tedavi stratejisine gereksinim vardır (5,11,18).

Flep veya replantasyon operasyonları gibi mikrovasküler cerrahi girişimlerde hastanın yaşı, ek bir sistemik hastalık varlığı, cerrah teknik, operatörün tecrübesi gibi bir çok faktörün yanında uygulanacak anestezi yöntemi de operasyonun etkinliğini temel olarak etkilemektedir (23,25,128). Cerrahi ilerlemelere rağmen iskemi-reperfüzyon hasarı flep cerrahisinde önemli bir problem olmaya devam etmektedir. Uygulanacak anestezi yönteminin transfer edilen dokuda sistemik ve bölgesel kan akımını etkilediği ortaya konmuştur. Bu nedenle vazospazmı ve perfüzyon bozukluğunu engelleyecek anestezi yönteminin uygulanmasının iskemi reperfüzyon hasarını azaltmada faydalı olacağı düşünülmektedir (127,131,132).

Flep transferi yapılırken kan akımının durmasıyla flebin anoksik hale gelmesi primer iskemi periyodudur. Anaerobik metabolizmaya bağlı olarak laktat birikimi, pH'da düşme, kalsiyum miktarında artış, enflamatuvar mediyatörlerin birikimi ve ayrıca oksijen yokluğunda zararsız olduğu düşünülen ancak oksijen varlığında hidroksil radikallerinin oluşumu için kaynak olan serbest oksijen radikallerinin birikimi gerçekleşir (10,13,22). Primer iskemide hasarın şiddeti iskemi ile

orantılıdır. Metabolik hızı yüksek dokular iskekiye daha duyarlıdır. İskelet kası iskemik hasara deriden daha duyarlıdır. Anastomoz sonrası vasküler klempin açılmasıyla reperfüzyon başlar. Normal olarak kan akımının yeniden sağlanması primer iskeminin oluşturduğu fizyolojik bozukluğu tersine çevirir. Flep minimal hasarla iyileşir. Ancak uzamış iskeki süresi ve kötü perfüzyon basıncı olayın bu şekilde gerçekleşmesine izin vermez (16,18). Yeniden oluşan kan akımı flebin nekrozuyla sonuçlanan enflamatuvar maddelerin girişine izin vermesiyle reperfüzyon hasarı meydana gelir. Sekonder iskeki serbest flebin transplante edilmesi ve reperfüzyonundan sonra gelişir. Bu iskeki periyodu flebe primer iskemiden daha çok zarar verir. Sekonder iskemiden etkilenen fleplerde masif intravasküler tromboz ve hücrelerarası ödem gelişir (1,2,16,19).

İskeki reperfüzyon hasarı tıbbın çeşitli dallarınca ilgi odağı haline gelmiş ve bu konuyla ilgili pek çok çalışma yapılmıştır. Ayrıca bu konu plastik, rekonstrüktif ve replantasyon cerrahisinde önemli bir yer tutmaktadır. Çeşitli travmaya veya malign tümör cerrahisine sekonder doku defektlerinin onarımında kullanılan fleplerde, uzuv amputasyonları onarımı sonrası gelişen iskeki reperfüzyon hasarını azaltmak amacıyla pek çok çalışma yapılmıştır. Ancak anestezi yöntemlerinin iskeki reperfüzyon hasarı üzerine olan etkileri konusunda yapılan klinik veya deneysel çalışma sayısı sık değildir. Bu konuyla ilgili kesin bir yaklaşım, yöntem veya sonuca ulaşamamıştır

Hastanın fizyolojik durumu transfer edilen dokuların canlılığında majör belirleyicidir. Cerrahi sürenin uzun olması, kan kaybı ve hipotermi ve bunlara sekonder gelişen hipovolemi ,vazokonstriksiyon ve hipotermi düzeltilmezse flebin kan akımı bozulur ve flep kaybı ile sonuçlanır. Bütün bunlar flep cerrahisinde anestezi hedefin vazodilatasyon, iyi perfüzyon ve düşük vizkosite olduğu sonucunu çıkarmaktadır. İnhalasyon anestezisi uygulanan vakalarda postoperatif dönemde gelişen bulantı, kusma, titreme, ağrı gibi semptomlar fleplerde kan akımı dengesini bozarak olumsuz etkileyebilmektedir (23,25,40,41). Bu süreçte mikrodolaşımda tıkanma ve flep kaybı meydana gelebilir. Postoperatif dönemde gelişen ağrı vazospazmı, vazospazm da ağrıyı tetikleyen durumlardır (42-45). Bölgesel anestezi

yöntemlerle yapılan sempatik blokajın vazodilatasyon oluşturarak perfüzyonu düzeltbildiği ve ağrıyı engelleyerek vazospazmın tetiklemesinin önüne geçebildiğini gösteren deneysel ve klinik çalışmalar bulunmaktadır (134).

Çalışmamızda bölgesel anestezi yöntemlerinin flep mikrodolaşımı üzerine olumlu etkilerinden farklı olarak iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini değerlendirdik. Bunun için deneklerde oluşturduğumuz TRAM flebinde gelişen iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetini belirlemek için MDA, PON, NO, TAS, TOS gibi biyokimyasal parametreleri kullandık.

İ-R yapılmayan sham grubu, kontrol grubu ile karşılaştırıldığında kontrol grubu İ-R hasarıyla uyumlu değişiklikler göstermiştir. Buna göre kontrol grubunda sham grubuna kıyasla MDA, TOS, NO seviyelerinde artmış ve PON, TAS seviyeleri azalmış olarak bulunmuştur. Artmış iskemi-reperfüzyon hasarına bağlı olarak oluşan serbest oksijen radikallerinin yol açtığı lipid peroksidasyonunun ara ürünlerinden biri olan dien konjugat ve son ürünlerden biri olan MDA doku düzeyleri tespit edilmiştir.

Lipid peroksidasyonu hidroksil radikallerinin, özellikle satüre olmamış hücre lipidleriyle reaksiyona girmesiyle başlar. Bu reaksiyon sonucu lipid radikalleri oluşur. Lipid radikalleri, çift bağlarında ortaya çıkan yapısal değişikliklerle dien konjugata dönüşür. Dien konjugat, O₂ varlığında lipid hidroperoksiradikale, o da lipid endoperoksiradikale dönüşür. Lipid endoperoksiradikal iki farklı yol izleyebilir; diğer lipid moleküllerini okside ederek daha stabil olan lipid hidroperoksit ve lipid radikali oluşturabilir, veya O₂ ve Fe⁺⁺ varlığında lipid alkoksiradikale dönüşebilir (119,120). Lipid alkoksiradikalın yıkılmasıyla alkil radikal, lipid aldehit ve MDA son ürünleri oluşur. Bu moleküller içinde, lipid peroksidasyonunun göstergesi olarak düzey ölçümü en uygun olan MDA olarak belirlenmiştir (144). Biz de bu çalışmada iskemik hasarın biyokimyasal göstergelerinden olan MDA doku düzeylerini tercih ettik. Çalışmada epidural anestezi grubunda MDA düzeyleri İ/R grubuna göre anlamlı olarak azalmıştır. Spinal anestezi grubu ile İ/R grubu arasında anlamlı fark yoktur. Bu bulgular literatürdeki çalışmalar ile uyum göstermektedir.

PON 1, paraokson, diazookson gibi organik fosfatları hidrolizleyerek detoksifiye edebilen geniş bir substrat spektrumuna sahiptir. PON 1'in iskemi reperfüzyon hasarına bağlı olarak oksidatif modifikasyonlara karşı lipoproteinleri koruduğuna inanılmaktadır. Jerzy ve arkadaşlarının yaptığı renal iskemi reperfüzyon modelinde hiperleptineminin iskemi reperfüzyon hasarını arttırdığını ve hem plazma hem de dokuda PON aktivitesini azalttığını göstermişlerdir (145,146). Bizim çalışmamızda epidural grubunda PON 1 aktivitesinin İ/R grubuna göre anlamlı şekilde yüksek olduğu bulunmuştur. Spinal grubu ile İ/R grubu arasında anlamlı fark yoktur.

Nitrik oksit İ/R hasarında vasküler tonüsün düzenlenmesi gibi bir çok fizyolojik olaylarda anahtar rol oynayan çok fonksiyonlu bir moleküldür. NO; L-arjininin terminal guanido nitrojeninden, önce hidroksi-L-arjinin sonra da L-sitrüllinin oluştuğu ve nitrik oksit sentetazın katalizlediği bir reaksiyondan oluşur. Oluşan NO hızla cGMP düzeyine artışa neden olarak düz kas hücrelerinde relaksasyon ile sonuçlanır. İskemi sırasında dokuda NO artar, ardından reperfüzyonla nötrofiller toplanır ve çeşitli yollardan süperoksit radikali artar ve peroksinitrit oluşur (98,150). Endotel hasarı ile nötrofil-endotel etkileşimi kısır döngüye girer. McCall ve arkadaşları lökositlerin İ/R hasarında önemli bir rolü olduğuna dair yaptıkları çalışmada NO'nin PNL agregasyonunu inhibe ettiklerini göstermişlerdir (151). İ/R hasarı ile ilgili olarak ilerleyen çalışmalar devam ederken NO konusunda bazı çelişkiler ortaya konmuştur. Üç farklı izoformu olan nitrik oksit iki fonksiyonel gruba ayrılır. Birisi yapısal NOS'dur. eNOS ve nNOS izoformları bu gruba girer (96). Bu enzimler Ca^{+2} bağımlı olup fizyolojik amaçlı düşük konsantrasyonlarda kısa patlamalarla NO üretir. Diğer sınıf ise indüklenebilir NOS'dur. Bu izoform Ca^{+2} bağımsızdır (101). Enzim aktive olduğu sürece yüksek miktarlarda NO üretir. Genel olarak eNOS koruyucu bir enzim olarak görülürken iNOS tarafından üretilen NO'nin toksik ve zarar verici bir ajan olduğu düşünülür (153). NO temel bir element olmasına ve çok farklı fizyolojik işlevlerde görev almasına karşın üretimi her zaman yararlı değildir. Aşırı olarak veya azalmış üretimi fizyopatolojik süreçlerde zararlı etkilere sahiptir. NO fizyolojik şartlarda fizyolojik işlevler için uygun düzeylerde üretilir. İ/R hasarı gibi çeşitli doku hasarlarında çok daha yüksek düzeylerde NO üretilir. NO'nin bu fazla üretimi hakkında ters iki yönde de görüşler vardır. Fazla NO

üretiminin hasar karşı koruyucu etkisi olduğunu belirten çalışmaların yanında zararlı olduğu yönünde çalışmalarda oldukça fazladır (150).

NO'nın zararlı etkileri reperfüzyonla birlikte oksijenin nitrik oksiti peroksinitrik radikallerine ve buna bağlı olarak lipit peroksidasyonuna ve aşırı Ca^{+2} neden olması şeklinde açıklanabilir (110,116,118). Bunlardan birincisi daha fazla NO üretimine neden olurlar ki bu aşırı NO daha fazla toksisite demektir. İkincisi mitokondriyal oksidatif fosforilasyon ve ksantin oksidaz yoluyla oksijen radikali oluşumunun artması ve buna bağlı hasarın artmasıdır. Üçüncüsü aşırı NO nedeniyle mitokondriyal solunum ve glikolizisin engellenmesi ve hücre ölümüdür. NO İ/R hasarında koruyucu olduğuna ve yaşayan alanı arttırdığına dair çalışmalar da oldukça fazladır (98,101,104-107). Örneğin Murat Türegün ve arkadaşları kas flepleri İ/R yaralanmalarında nitrik oksit ve donörlerinin mikrosirkülasyon üzerine etkilerini araştırmışlar ve NO'nın lökosit-endotel yapışma etkileşimlerini engelleyerek kas fleplerinde, İ/R yaralanmasının engellenmesi veya etkisinin azaltılmasında faydalı olabileceği sonucuna varmışlardır. Meldrum ve arkadaşları yaptıkları çalışmada, sıçan iskelet kasında L-NAME ve L-Arjininin iskemi reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini incelemişler ve çalışmalarında L-NAME ve NO inhibitörlerinin NO toksisitesini düşürerek yaşayan alanı arttırdıklarını bildirmişlerdir (101,104).

Böyle çift yönlü etkilere rağmen NO'nın İ/R hasarında koruyucu ve yaşayan alanı artırıcı etkisini benzer sonuçlarla ortaya koyan ve bunu flepler üzerinde de gösteren bir çok çalışma vardır. Suzuki ve arkadaşlarının rat dorsal deri flep modelinde yaptıkları çalışmada L-arjinin ve L-NAME verilip lazer dopler ile kan akımını incelemişlerdir. L-arjinin ile yaşayan alan önemli ölçüde artarken L-NAME ile azalmıştır (154). Çalışmamızda gruplar arasında NO seviyeleri arasında anlamlı farklılık saptanmamıştır. Bunun sebebinin NO'nın farklı dokularda farklı etki göstermesi, dokulardaki akım miktarlarının farklı olması ve yapılan çalışmada NOS izoformlarının her birinin ayrı ayrı eksik olduğu transgenik deneklerin kullanılmasından kaynaklandığını düşünmekteyiz.

Serbest oksijen radikallerinin oluşumunun önlenmesi, oluşan radikallerin ortadan kaldırılması veya baskılanması, radikal zincir reaksiyonlarının kırılması, hasara uğrayan hedef moloküllerin tamiri veya uzaklaştırılmasında, geçiş metal iyonların bağlanmasında rol alan enzimatik olan ve olmayan antioksidanlar genel olarak TAK başlığı altında toplanabilir (148,155). Biyolojik sistemlerde, serbest radikallerin etkilerinden organizmayı koruma görevini üstlenen antioksidan sistemler vardır. Bu sistemler, enzimatik ve nonenzimatik olarak ikiye ayrılırlar. Genel olarak enzimatik antioksidanlar hücre içinde enzimatik olmayan antioksidanlar hücre dışında etkilidir. Enzimatik olanlar süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (KAT), glutatyon peroksidaz (GPx)'dir (104,105). Enzimatik olmayanlar ise organizmada metabolik faaliyetler sonucu oluşan ve beslenme ile vücuda alınan antioksidanlardır. Bu sistemler, dokularda ve kanda bulunurlar. Dokuda bulunan antioksidanların konsantrasyonları ayrı ayrı tayin edilebilmektedir. Ancak zaman aldığı, pahalıya mal olduğu, kompleks teknikler gerektirdiği için tercih edilmez (107). Bu nedenle plazmada total antioksidan kapasitenin tayini için yöntemler geliştirilmiştir. Bu yöntemler, literatürde total antioksidan kapasite (TAK), total antioksidan aktivite (TAA), total antioksidan güç (TAOP), total antioksidan durum (TAS) tayini gibi farklı isimler kullanılarak tanımlanmalarına rağmen hepsinin amacı ve prensibi aynıdır (156). TAK tayini ile dokuda entegre olmuş antioksidanların toplam aktivitesi bulunur. Dokudaki her bir antioksidanın aktivitesinin hesaplanıp değerlerin toplanmasından sonra elde edilen değer ile TAK sonuçları birbirinden farklıdır. Bu yöntem ile dokudaki bilinen ve bilinmeyen antioksidan maddelerin ve bunların sinerjik etkileşimleri sonucu ortaya çıkan antioksidan kapasite tayin edilir. Bu şekilde oksidan/antioksidan sistemler arasındaki *in vivo* denge daha kolay anlaşılmaktadır (157).

TAK tayini ile dokuda olmuş antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir bu yüzden dokunun antioksidatif durumunu saptamada bireysel antioksidanlardan ziyade bunların toplam antioksidan değerini veren toplam antioksidan kapasite ölçümü yaygınlaşmaktadır. Bu yüzden çalışmamızda çelişkiyi bir nebze de olsa açığa kavuşturmak için Erel tarafından geliştirilen ve günümüzde en popüler metod olarak kabul edilen yöntemle total

antioksidan kapasite ölçümünü tercih ettik (148). Total Antioksidan yöntemle dokuda bulunan total –SH, vitamin C, ürik asit, vitamin E, Bilirubin ve diğer birçok antioksidan hassas bir şekilde ölçüldü. Çalışmamızda epidural anestezi grubunda TAK seviyeleri spinal ve İ/R grubuna göre anlamlı şekilde yükselmiştir. Lazar ve arkadaşlarının yaptıkları deneysel çalışmada, torasik bölgeden yapılan epidural anestezinin, gastrik tüpün distal kısmındaki mikrovasküler perfüzyonu önemli ölçüde arttırdığını göstermiş ve bu tekniğin rekonstrüktif özofagus cerrahisinde kullanımını önermişlerdir (141). Demirağ ve arkadaşları ise, akut pankreatit tarafından indüklenen pankreatik hipoperfüzyonunun, epidural anestezi sayesinde azaldığını ayrıca doku hasarını ortadan kaldırdığını göstermişlerdir (44). Bu çalışmaların ışığında epidural anestezinin sinir köklerinde sempatik blokaja bağlı vazodilatasyona neden olduğunu ve ayrıca cerrahi işlem esnasında ve sonrasında gelişecek vazospazmı engellediği söylenebilir. Sonuç olarak epidural anestezi grubunda TAK seviyesindeki yükselmenin, hem flebe olan kan akımında hem de flebin içindeki kan akımındaki düzelmeye bağlamaktayız.

Soluduğumuz havada renksiz, kokusuz ve tatsız bir molekül olarak bulunan oksijen, ilk kez 1770’li yıllarda moleküler oksijen olarak tanımlanmıştır. Oksijen canlıların yaşamlarını sürdürebilmesi için mutlak gerekli bir elementtir. Oksijen, yaşam için vazgeçilmez bir molekül olmasına rağmen aynı zamanda vücut içinde ROT’nin oluşmasına neden olur. ROT metabolizmaya zarar verebilecek bir dizi reaksiyonu başlatır ve bunlar canlı için aynı zamanda bir tehdit oluşturmaktadır (102-104,105).

Organizmada serbest radikallerin oluşum hızı ile bunların ortadan kaldırılma hızı bir denge içerisinde ve bu durum oksidatif denge olarak adlandırılır. Oksidatif denge sağlandığı sürece organizma, serbest radikallerden etkilenmemektedir. Bu radikallerin oluşum hızında artma ya da ortadan kaldırılma hızında bir düşme bu dengenin bozulmasına neden olur. ‘Oksidatif stres’ olarak adlandırılan bu durum özetle; serbest radikal oluşumu ile antioksidan savunma mekanizması arasındaki ciddi dengesizliği göstermekte olup, sonuçta doku hasarına yol açmaktadır. Biyolojik sistemlerdeki reaktif oksijen türleri (ROT), süperoksit anyonu ($2O_2^-$), hidroksil

radikali ($\text{HO}\cdot$), nitrik oksit ($\text{NO}\cdot$), peroksil radikali ($\text{ROO}\cdot$), ve radikal olmayan hidrojen peroksit (H_2O_2) gibi serbest radikaller oksidatif stresin en önemli nedenlerinden birini oluşturlar (107,110,112). Çalışmamızda dokuda bulunan hidroksil, hidrojen peroksit, singlet oksijen, lipid hidroperoksit, süperoksit gibi serbest radikallerin sebep olduğu oksidatif stresi ölçmek için Erel tarafından geliştirilen total oksidatif stres ölçüm metodu kullanıldı. Perhoniemi ve Linko yirmi hastada spinal ve epidural anestezinin alt ekstremité kan akımına olan etkisini araştırmışlar ve yaptıkları çalışmada arteryal kan akımının spinal anestezile karşılaştırıldığında epidural anestezide daha yüksek olduğunu saptamışlardır. Ayrıca epidural anestezide sempatik blokajın spinal anesteziden daha yoğun olduğunu göstermişlerdir (22,23,41-44). Literatür bilgileri ile uyumlu olarak çalışmamızda epidural anestezi grubunda total oksidatif stres düzeyleri İ/R ve spinal grubuna göre anlamlı derecede düşüktür.

Her doku iskemik sürece karşı bir süre kendi enerji depoları ile idare edebilirler. Ancak iskemi süreci uzadıkça bir noktadan sonra dokuların enerji depoları tükenir ve iskemiyeye bağlı kalıcı hücre hasarı gelişir (18-20). Her dokunun kendine özgü kritik iskemi süresi vardır. Normotermik koşullarda bu süre iskelet kasında 4 saat, sinir dokusunda 8 saat, yağ dokusunda 13 saat, deride 24 saat ve kemik dokusunda 4 gün olduğu bilinmektedir. Bu veriler, iskelet kasının iskemiyeye en duyarlı doku olduğunu göstermektedir (22). Belkin ve arkadaşlarının sıçan arka bacağına turnikeyle oluşturdukları iskemi-reperfüzyon modelinde kaslarda ciddi hasarın, iskeminin üçüncü saatinde başladığını ve altıncı saatte kontrol grubuna oranla kasta sadece %3 fonksiyon varlığı kaldığını bildirmişlerdir (32). Labbe ve arkadaşları, köpek grasilis kas İ/R modelinde yaptıkları çalışmada, iskeminin üçüncü saatinde % 2 olan nekroz oranının, dördüncü saatte % 30'a, beşinci saatte ise % 90'a kadar yükseldiğini ve nekrozun kasın merkezinde daha fazla olduğunu bildirmişlerdir (39,40).

Hayes ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmada, iskemi sonrasında oluşan kas nekrozunun dokudaki adenosin-tri-fosfat (ATP) miktarlarıyla yakından ilişkili olduğunu göstermişlerdir. ATP'nin tükenmeye başladığı durumlarda önce glikojen

ve kreatinin fosfat enerji kaynağı olarak devreye girmektedir. Anaerobik metabolizmanın kullanılması sonucu ortaya çıkan laktat hücre içi pH'sını düşürmektedir (64,73). Ayrıca ATP yetersizliğine bağlı olarak, hücre zarından geçiş işlevleri bozulmakta ve birbirine bağlı olayların tetiğini çeken Ca^{+2} ile proenflamatuvar aracı maddeler hücre içerisinde birikmeye başlamaktadır. Anaerobik metabolizmanın kullanılması ayrıca oksijen radikallerinin oluşumunu hızlandırmaktadır (69,70). Im ve arkadaşları, sonrasında Manson ve arkadaşlarının yaptıkları çalışmalarda; anaerobik metabolizma esnasında toksik süperoksit radikallerinin biriktiğini ve bu maddelerin, deri fleplerinde iskemik geçiş bölgesindeki nekrozdan sorumlu olduklarını göstermişlerdir (71).

Günümüzde, flep mikrodolaşımı hakkındaki bilgilerin ve mikrocerrahi tekniklerin gelişmesi sayesinde, serbest doku aktarımında başarı oranları % 91-99 arasında değişmektedir. Bununla beraber cerrahi sonrası dönemde oluşan dolaşım sorunlarına bağlı tekrar ameliyata alma oranları % 6 ile 25 arasındadır. Serbest doku aktarımlarından sonra revizyona alınan olgularda flebi kurtarma oranları ise % 28 ile % 90 arasındadır (123). Serbest kas fleplerinde iskemi duyarlılığı, sadece cilt ve cilt altı doku içeren fleplere oranla daha yüksektir. Bu sebeple anastomoz süresinin uzamasına veya anastomoz sonrası pedikülde tıkanma olmasına bağlı iskemik kalan kaslarda İ-R hasarının olumsuz etkileri daha sık görülmektedir (111,130). Ayrıca pediküllü rektus abdominus veya latissimus dorsi flepleri gibi myokutanöz fleplerde hematoma veya çevresel dokuların basısına bağlı iskemiler görülebilmekte ve bunun sonucunda kısmi ve hatta tam flep kayıpları görülebilmektedir. İ-R hasarının önlenmesi için alınabilecek önlemlerin başında iskemi sürelerinin mümkün olduğunca kısa tutulması gelmektedir. Alınan tüm önlemlere karşın serbest doku nakillerinde, replantasyonlarda ve pedikülünde bası ya da tromboza bağlı tıkanıklık oluşan fleplerde, iskemi süreleri uzayabilmektedir. Bu gibi durumlarda alınabilecek diğer bir önlem ise kas flebinin iskemiye dayanıklılığının artırılmasıdır. Bu amaçla literatürde İ-R hasarının önlenmesi için pek çok ajan veya yöntem deneysel olarak kullanılmış ve başarılı sonuçlar bildirilmiştir (28,29,39,71,99,109,114). Bu ajan ve yöntemlerin bazıları antikoagülanlar, anti-enflamatuvarlar, antioksidanlar, vazodilatörler, immün sistem düzenleyiciler, arakidonik asit antimetabolitleri,

nötrofil yapışma önleyicileri ve iskemik önkoşullandırmadır (85,100,109,124). Deneysel olarak etkinliği kanıtlanmış pek çok yöntem ile İ-R hasarının azaltılabileceği gösterilmişken bunlardan pek azı klinik olarak kullanılabilmektedir. Bunun en önemli sebebi deneysel olarak etkinliği gösterilen pek çok ajanın klinik olarak temin edilmesinin veya uygulanmasının güç olmasıdır.

İskelet kası İ/R hasarı ile ilgili olarak tıbbın çeşitli alanlarında yapılmış bir çok çalışma olmasına rağmen İ/R hasarının histopatolojik olarak değerlendirilmesinde ortak bir klasifikasyon veya skora sistemi bulunmamaktadır. Çalışmamızda kas dokusunda iskemi reperfüzyon hasarını değerlendirmek amacıyla W. O. Carter ve arkadaşlarının kullandığı histopatolojik skora sistemini kullandık (149). Alınan doku örneklerinde polimorf nüveli lökosit infiltrasyonu, segmental nekroz, enine çizgilenmelerde kayıp, çekirdeklerin merkeze göçü, kas liflerinde ayrılma, bağ dokusunda artış, interselüler ve interfaziküler ödem gibi dejeneratif bulgular incelendi. Çalışmadan elde edilen bulgulara sham grubunda kas dokusunun normal yapısının korunduğu gözlemlendi. İ/R grubunda enflamasyon ve hyalinizasyonla birlikte bazı kas liflerinde çekirdeğin merkeze göçü, enine çizgilenmelerde kayıp ve segmental nekroz saptandı. Spinal anestezi grubunda hyalinize globüler değişiklik, kas liflerinde düzensizlik ile kas liflerinde dejenerasyon çekirdeğin merkeze göçü ve enflamasyon dikkat çekmektedir. Epidural anestezi grubunda İ/R grubuna benzer enflamasyon ve hyalinizasyon izlenmiştir.

Yüksek metabolik aktivite ve rijid fasyal yapılardan dolayı kas dokusu iskeleminde daha dayanıksızdır. Kritik iskemi süresi deri fleplerine göre kas fleplerinde daha kısadır. Değişik anestezi tekniklerinin kas fleplerinde iskemi-reperfüzyon hasarı üzerine etkilerini araştırdığımızda kombine inhalasyon ve epidural anestezi tekniği flep cerrahisinde önerilmesine rağmen kullanımı tartışmalıdır (124,128,131). Scott ve arkadaşları alt ekstremitelerde serbest doku transferinde tek başına genel anestezi ile kombine genel anestezi ve epidural anestezi tekniklerini karşılaştırmışlardır. Kombine genel ve epidural anestezi grubunda mikrovasküler komplikasyonlarda anlamlı azalma ve flep canlılığında anlamlı artış saptamışlardır. Çalışmamızda İ/R hasarını takiben epidural anestezinin oksidatif stresi azaltmada koruyucu rol

üstlendiğini saptadık. Bu olumlu etki epidural anestezinin ağrı kontrolü ve sempatolitik aktiviteden kaynaklandığını düşünmekteyiz. Literatürde spinal anestezinin kas fleplerinde İ/R hasarı üzerine faydalı etkileri olduğunu belirten çalışma bulunamadı. Spinal anestezinin olumsuz etkileri tam olarak açıklanamamaktadır. Olası mekanizmanın aşırı abartılı hemodinamik değişiklik ve sempatik blokaja bağlı olarak flepte kan akımının azalması ile sonuçlanan “*vasküler çalma fenomeninden*” kaynaklandığı düşünülmektedir.

6. SONUÇ

Rekonstrüktif flep operasyonları oldukça uzun sürebilen operasyonlardır ve cerrahi ekibin becerisi, hastanın genel durumu, ağrı ve ısının kontrolü, intraoperatif dönemde uygun sıvı tedavisiyle yeterli hemodinaminin sağlanması yanında hastaya uygulanacak anestezi yöntemi de oldukça önem arz etmektedir. Ancak mikrocerrahide hangi anestezi tekniği ve anestetik ajanların kullanımının daha uygun olduğu konusunda halen aydınlatılması gereken konular olup daha fazla klinik ve deneysel çalışmaya gereksinim vardır.

Bu çalışmanın sonucunda elde edilen bulgular şöyledir:

1. TRAM kas-deri flebi modelinde epidural anestezi hücre membranının iskemi ve serbest oksijen radikallerinden lipid hasarını, bu hasarın göstergesi olan MDA düzeyini spinal anesteziye göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşürmüştür.

2. Bu modelde epidural anestezi, süperoksit radikallerinin spesifik yakalayıcılarının göstergesi olan total antioksidan kapasite seviyesini istatistiksel olarak anlamlı şekilde koruyarak oksidatif hasardan korunmada hücreye destek sağlamaktadır.

3. Epidural anestezi protein oksidasyonunun engellenmesinden ve hücrelerdeki enzim sisteminin korunmasından sorumlu PON 1 seviyelerinin anlamlı şekilde korunmasını sağlamıştır.

4. Gruplar arasında nitrik oksit seviyeleri arasında anlamlı farklılık bulunmamıştır.

5. Epidural anestezi, oluşturulan modelde spinal anesteziye göre serbest oksijen radikallerinin oluşturduğu oksidatif hasarı gösteren total oksidatif stresde anlamlı azalmaya neden olmuştur.

6. Spinal anestezi altında oluşturulan İ/R modelinde kas liflerinde düzensizlik, nükleer değişiklik, hyalinizasyon gibi dejeneratif bulgular ve yangısal hasarın şiddetinin epidural anesteziye göre anlamlı şekilde yüksek olduğu gösterilmiştir.

7. KAYNAKLAR

- 1.** Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery*. 2004;24(6): 468-75. Review.
- 2.** Carrol WR, Esclamado RM. Ischemia/reperfusion injury in microvascular surgery. *Head Neck*. 2000 Oct; 22(7): 700-13. Review.
- 3.** Daniel RK, Kerrigan CL. Principles and physiology of skin flap surgery. In:McCarthy JG, May JW, Littler JW (eds), *Plastic Surgery, Volume I*. WB Saunders Company, Philadelphia 1990; pp:275.
- 4.** Vedder NB. Flap Physiology. In: Mathes SJ, Hentz VR (eds), *Plastic Surgery, Volume I*. WB Saunders Company, Philadelphia 2006; pp:483-506.
- 5.** Lamberty BGH, Healy C. Flaps: Physiology, principles of design, and pitfalls. *Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery*. Little, Brown and Company, 1th edition. 56-70, 1994.
- 6.** McCarthy JG. Introduction to plastic surgery. *Plastic Surgery*. W.B. Saunders Company, 1th edition. 1-68, 1990. 49.
- 7.** Fisher J. Basic principles of skin flaps. In Georgiade GS, Georgiade NG, Riefkohl R (Eds.). *Textbook of Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery*, 2nd edition. Williams & Wilkins, 29-40, 1992.
- 8.** Luce EA. Analysis of complex postextirpative deformity. *Clin Plast Surg* 22(1): 1-8,1995.
- 9.** Mathes SJ Muscle flaps and their blood supply. In Aston SJ, Beasley RW, Thorne CHM (Eds.), *Grabb and Smith's Plastic Surgery*. 5th edition. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 61-71, 1997.

- 10.** Vanconez LO, Gamboa-Bobadilla M, Bentley MP. Skin flaps, fasciocutaneous flaps, and musculocutaneous flaps. *Mastery of Plastic and Reconstructive Surgery*. Little, Brown and Company, 1th edition. 71-87, 1994.
- 11.** Mathes SJ, Chang KN. Muscle and musculocutaneous flaps. In Georgiade GS, Georgiade NG, Riefkohl R. (Eds.), *Textbook of Plastic, Maxillofacial and Reconstructive Surgery*, 2nd edition. Williams & Wilkins, 41-46, 1992.
- 12.** Wang W, Qi Z, Lin X et al. Neurovascular musculus obliquus internus abdominis flap free transfer for facial reanimation in a single stage. *Plast Reconstr Surg* 110(6): 1430- 1440, 2002.
- 13.** Stremel RW, Zonnevillje ED. Re-animation of muscle flaps for improved function in dynamic myoplasty. *Microsurgery* 21(6): 281-286, 2001.
- 14.** Lin SH, Chuang DC, Hattori Y, Chen HC. Traumatic major muscle loss in the upper extremity: reconstruction using functioning free muscle transplantation. *J Reconstr Microsurg* 20(3): 227-235, 2004.
- 15.** Kuz JE, Van Heest AE, House JH. Biceps-to-triceps transfer in tetraplegic patients: report of the medial routing technique and follow up of three cases. *J Hand Surg*. 24(1): 161-172, 1999.
- 16.** Jansen D. Flaps, muscle and musculocutaneous flaps. *eMedicine Journal-Plastic Surgery* June 7, 2002.
- 17.** Kauhanen MS, Salmi AM, Von Bouslawsky EK et al. Muscle diameter and muscle type distribution following free microvascular muscle transfers: a prospective study. *Microsurgery* 18(2): 137-144, 1998.
- 18.** Gabriel A, Chaney N, Stephenson LL, Zamboni WA. Effect of total venous occlusion on capillary flow and necrosis in skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg*. 2001;108:430–433.

- 19.** Kerrigan CL, Wizman P, Hjortdal VE, Sampalis J: Global flap ischemia: a comparison of arterial versus venous etiology. *Plast Reconstr Surg* 1994;93:1485-1495, discussion 1496-1497.
- 20.** Khalil AA, Aziz FA, Hall JC. Reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg*. 2006; 117:1024-33.
- 21.** Myers MB, Cherry G: Mechanism of delay phenomenon. *Plast Reconstr Surg* 1969;44:52-57.
- 22.** Blaisdell FW: The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* 2002; 10:620-630.
- 23.** Sigurdsson GH, Thomson D. Anaesthesia and microvascular surgery: clinical practice and research. *Eur J Anaesthesiol* 1995;12: 101-22.
- 24.** Macdonald DJ. Anaesthesia for microvascular surgery. A physiological approach. *Br J Anaesth*. 1985;57: 904-12.
- 25.** Hagau N, Longrois D. Anesthesia for free vascularized tissue transfer. *Microsurgery* 2009;29: 161-7.
- 26.** Volta CA, Alvisi V, Petrini S, Zardi S, Marangoni E, Ragozzi R, Capuzzo M, Alvisi R. The effect of volatile anesthetic on respiratory system resistance in patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Anesth Analg* 2005;20: 100-109.
- 27.** Preckel B, Schlack W, Comfere T, Obal D, Barthel H, Thamer V. Effects of enflurane, isoflurane, sevoflurane, and desflurane on reperfusion injury after regional myocardial ischemia in the rabbit heart in vivo. *Br J Anaesth*. 1998;81: 905–912.
- 28.** Banic A, Krejci V, Erni D, Wheatley AM, Sigurdsson GH. Effect of sodium nitroprusside and phenylephrine on blood flow in free musculocutaneous flaps during general anesthesia. *Anesthesiology*. 1999;90: 147–155.

- 29.** Salman AE, Dal D, Salman MA, ve ark: The effect of ketamine on acute muscular ischemia reperfusion injury in rats. *Eur J Anesthesio* 2005; 22: 712-716
- 30.** Aldemir O, Çelebi H, Çevik C, ve ark: The effects of propofol or halothane on free radical production after tourniquet induced ischeia-reperfusion injury during knee arthroplasty. *Acta Anesthesiol Scan.* 2001; 45: 1221-1225.
- 31.** Yağmurdur H, Çakan T, Bayrak A: The effects of etomidate, thiopental, and propofol in induction on hypoperfusion-reperfusion phenomenon during laparoscopic cholecystectomy. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2004; 48: 772-777.
- 32.** Turan R, Yağmurdur H, Kavutçu M: Propofol and tourniquet induced ischaemia reperfusion injury in lower extremity operations. *Eur J Anaesthesiol.* 2007; 24: 185-189.
- 33.** Corbucci GG, Marchi A, Velluti C: Antioxidant property of Propofol in the ischemic and reperfused human skeletal muscle. *Minerva Anesthesiol.* 2002; 68: 13-16.
- 34.** Cheng JC, Wang Y, Chien T ve ark: Small-dose propofol sedation attenuates the formation of reactive oxygen species in tourniquet-induced ischemia-reperfusion injury under spinal anesthesia. *Anesth Analg.* 2002; 94: 1617-1620.
- 35.** Balyasnikova İ, Visintine DJ, Gunnerson HB, ve ark: Propofol attenuates lung endothelial injury induced by ischemia-reperfusion and oxidative stress. *Anesth Analg.* 2005; 100: 929-936.
- 36.** Liu K-X, Rinne T, He W, ve ark: Propofol attenuates intestinal mucosa injury induced by intestinal ischemia-reperfusion in the rat. *Can J Anesth.* 2007; 54(5): 366-374.
- 37.** Wang H-H, Zhou H-Y, Chen C-C ve ark: Propofol attenuation of renal ischemia-reperfusion injury involves heme oxygenase-1. *Acta Pharmacol Sin.* 2007; 28: (8): 1175-1180.

- 38.** Acquaviva R, Campisi A, Murabito P et al: Propofol attenuates peroxynitrite-mediated DNA damage and apoptosis in cultured astrocytes. *Anesthesiology*. 2004; 101: 1363-1371.
- 39.** Corcoran TB, Engel A, Sakamoto H et al: The effects of propofol on neutrophil function, lipid peroxidation and inflammatory response during elective coronary artery bypass grafting in patients with impaired ventricular function. *Br J Anaesthesia*. 2006; 97: 6: 825-836.
- 40.** Banic A, Krejci V, Erni D, Petersen-Felix S, Sigurdsson GH. Effects of extradural anesthesia on microcirculatory blood flow in free latissimus dorsi musculocutaneous flaps in pigs. *Plast Reconstr Surg*. 1997;100: 945-55.
- 41.** Scott GR, Rothkopf DM, Walton RL. Efficacy of epidural anesthesia in free flaps to the lower extremity. *Plast Reconstr Surg*. 1993;91:673-7.
- 42.** Lanz OI, Broadstone RV, Martin RA, Degner DA. Effects of epidural anesthesia on microcirculatory blood flow in free medial saphenous fasciocutaneous flaps in dogs. *Vet Surg*. 2001;30:374-9.
- 43.** Inberg P, Tarkkila PJ, Neuvonen PJ, Vilkki S. Regional anesthesia for microvascular surgery: a combination of brachial plexus, spinal, and epidural blocks. *Reg Anesth*. 1993;18:98-102.
- 44.** Demirağ A, Pastor CM, Morel P, Jean-Christophe C, Sielenkämper AW, Güvener N, Mai G, Berney T, Frossard JL, Bühler LH. Epidural anaesthesia restores pancreatic microcirculation and decreases the severity of acute pancreatitis. *World J Gastroenterol*. 2006;12:915-20.
- 45.** van Twisk R, Gielen MJ, Pavlov PW, Robinson PH. Is additional epidural sympathetic block in microvascular surgery contraindicated? A preliminary report. *Br J Plast Surg*. 1988; 41:37-40.
- 46.** Alam NH, Haeney JA, Platt AJ. Three episodes of gracilis free muscle transfer under epidural anesthesia. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 2006;59:1463–1466.

- 47.** Hartrampf C, Schefflan M, Black P. Breast reconstruction with a transverse abdominal island flap. *Plast Rec Surg.* 1982; 69: 216-25.
- 48.** Hammond DC, Larson DL, Severinac RN, Marcinas M. Rectus abdominis muscle innervation: implications from TRAM flap elevation. *Plast Reconstr Surg.* 1995; 96: 105-10.
- 49.** McCraw JB, Dibbel DG, Carraway JH: Clinical definition of independent myocutaneous vascular territories, *Plastic Reconstructive Surgery.* 60: 341, 1997.
- 50.** Wallace AF: History of plastic surgery, *J R Soc Med.* 71: 834, 1978.
- 51.** McCraw JB, The recent history of myocutaneous flaps. *Clinical Plastic Surgery.* 7: 3-7, 1980.
- 52.** Mathes SJ, Nahai F. Classification of the vascular anatomy of muscles: Experimental and clinical correlation. *Plastic Reconstructive Surgery.* 67: 1177-1187, 1981.
- 53.** Boyd JB, Taylor GI, Corlett R. The vascular territories of the superior epigastric and the deep inferior epigastric systems. *Plast Reconstr Surg.* 73: 1, 1984.
- 54.** Dunn RM, Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg.* 31: 352, 1993.
- 55.** Kao SD, Zhang F. Rectus abdominis muscle free flap and myocutaneous flap. *Manual of Experimental Muscle Flap and Organ Transplantation Models in the Rat* (Ed: F. Zhang, W. C. Lineaweaver, S. D. Kao, R. Walker, H. Tonken), Reading, 1995; s: 25.
- 56.** Mathes SJ, Botswick J. A rectus abdominis myocutaneous flap to reconstruct abdominal wall defects. *Br J Plast Surg.* 30: 282, 1977.
- 57.** Milloy FJ, Anson BJ, McAfee DK: The rectus abdominis muscle and epigastric arteries. *Surg Gynecol Obstet.* 110: 293, 1960.

- 58.** Moon HK, Taylor GI: The vascular anatomy of rectus abdominis musculocutaneous flaps based on the deep superior epigastric system. *Plast Reconstr Surg.* 82: 815, 1988.
- 59.** Özgentaş HE, Shenaq S, Spira M. Development of a TRAM flap model in the rat and study of vascular dominance. *Plast Reconstr Surg.* 94: 1012, 1994.
- 60.** Pennigton DG, Pelly AD: The rectus abdominis myocutaneous free flap. *Br J Plast Surg.* 33: 277, 1980.
- 61.** Tai Y, Hasegawa H. A transverse abdominal flap for reconstruction after radical operations for recurrent breast cancer. *Plast Reconstr Surg.* 53: 52, 1974.
- 62.** Taylor GI, Corlett RJ, Boyd JB: The versatile deep inferior epigastric (inferior rectus abdominis) flap. *Br J Plast Surg.* 37: 330, 1984.
- 63.** Tezel E, Numanoglu A, Bayramiçli M, Sav A: Fat prefabrication by fascial flap. *Br J Plast Surg.* 53: 155, 2000.
- 64.** Wolff K-D, Stiller D: Functional aspects of free muscle transplantation: Atrophy, reinnervation and metabolism. *J Reconstr Microsurg.* 8: 137, 1992.
- 65.** Yim K, Gençosmanoğlu R, Lineaweaver W, Oliva A, de la Peña J, Briones R, Newlin L and Buncke H: Muscle and myocutaneous flaps in rats. *Basic and Applied Myology: Perspectives for the 90's.* Unipress, Padova, 1991; s:363.
- 66.** Yim KK and Lineaweaver WC. Microvascular muscle and myocutaneous transplantation models in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 10: 261, 1994.
- 67.** Zhang F, Kao S. Microvascular transfer of the rectus abdominis muscle and myocutaneous flap in rats. *Microsurgery* 14: 420, 1993.
- 68.** Sones WD, Lineaweaver WC, Zhang F. Microsurgical flap models in the rat. *J Reconstr Microsurg.* 17: 211, 2011.

- 69.** Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischemia-reperfusion injury. *J Pathol.* 2000;190:255-66.
- 70.** Collard CD.,Gelman S. Pathophysiology , Clinical manifestations and prevention of ischemia-reperfusion Injury. *Anesthesiology* 2001; 94: 1133-8.
- 71.** Reilly PM, Schiller HJ, Bulkley GB. Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and others reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488-503.
- 72.** Eltzschig HK, Collard CD. Vascular ischaemia and reperfusion injury. *Br Med Bull.* 2004; 70: 71-86.
- 73.** Gute DC, Ishida T et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Moll Cell Bio.* 1998; 179. 169-187.
- 74.** Cryer HG: Therapeutic approaches for clinical ischemia and reperfusion injury. *Shock* 8 (1997) 26-32.
- 75.** Tosa Y, Andrew Lee WP, Kollias N, Casanova R, Randolph MA, and May JW. Monoclonal antibody to intercellular adhesion molecule-1 protects rat skin flap against ischemia-reperfusion injury. In K. Harii (Ed.), *Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery: Transactions of the 11th Congress of the international Confederation.* Amsterdam: Kugler, 1995.
- 76.** Mowlavi, A., Neumeister, M. W., Wilhelmi, B., et al. Local hypothermia during early reperfusion protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury. *Plast. Reconstr. Surg.* 2003; 111: 242-50.
- 77.** Wagh, M., Pantazi, G., Romeo, R., et al. Cold storage of rat skeletal muscle free flaps and pre-ischemic perfusion with modified UW solution. *Microsurgery.* 2000; 20: 343-9.
- 78.** De Greef KE et al: Neutrophils and acute ischemia-reperfusion injury. *J Nephrol.* 1998, 11: 110-122.

- 79.** Schoenberg MH, Beger HG. Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit Care Med.* 1993; 21: 1376-1386.
- 80.** Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 2007; 376): 1-43. Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue/reperfusion. *Clin Cardiol.* 1993; 16(4 Suppl 1): I19-26.
- 81.** Orrenius S, Burkitt MJ, Kass GE, Dypbukt JM, Nicotera P. Calcium ions and oxidative cell injury. *Ann Neurol.* 1992; 32 Suppl: S33-42.
- 82.** 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 Radic Res Commun.* 1989;7: 255-64.
- 83.** Kloner RA, Przyklenk K, Whittaker P. Deleterious effects of oxygen radicals in ischemia/reperfusion. Resolved and unresolved issues. *Circulation* 1989; 80: 1115-27.
- 84.** Wechselberger G, Schoeller T, Ohler K et al. Flap salvage in a “flowthrough” flap by manual thrombectomy plus thrombolytic therapy. *J Reconstr Microsurg.* 1998;14: 127-9.
- 85.** Carroll SM, Overgoor ML, Tobin G, Barker JH: Acute ischemic preconditioning of skeletal muscle prior to flap elevation augments muscle flap survival. *Plast Reconstr Surg.* 1997;100: 58-65.
- 86.** Beyer RE: An Analysis Of The Role Of Coenzyme Q in free radical generation and as an antioxidant. *Biochem Cell. Biol.* 1992: 70 : 390-403.
- 87.** Parks DA, Granger DN: Xanthine oxidase: Biochemistry, distribution, physiology. *Acta Physiol Scand (suppl)* 1986; 548: 87-99.
- 88.** Jarasch ED, Bruder G et al: Significance of xanthine oxidase in capillary endothelial cells. *Acta Physiol Scand. (suppl)* 1986; 548: 39-46.

- 89.** Grisham MB, hernandez LA, Grander DN: Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischaemia. *Am J Physiol.* 1988; 251: G567-G574.
- 90.** Parks DA, Williams TK, Beckman JS. Conversion of xanthine dehydrogenase to oxidase in ischemic rat intestine: a reevaluation. *Am J Physiol.* 1988 May;254(5 Pt 1): G768-74.
- 91.** Simpson PJ, Mickelson JK, Lucchesi BR. Free radical scavengers in myocardial ischemia. *Fed proc.* 1987;46: 2413-21.
- 92.** Gutteridge JM. Iron promoters of the Fenton reaction and lipid peroxidation can be released from haemoglobin by peroxides. *FEBS Lett.* 1986; 201: 291–295.
- 93.** Kehrer JP. The Haber–Weiss reaction and mechanisms of toxicity. *Toxicology* 2000; 149: 43–50.
- 94.** Reilly PM, Schiller HJ, Bulkey GB: Pharmacologic approach to tissue injury mediated by free radicals and other reactive oxygen metabolites. *Am J Surg.* 1991; 161: 488-502.
- 95.** Kılınç K. , Kılınç A: Oksijen toksisitesinin aracı molekülleri olarak oksijen radikalleri. *Hacettepe Tıp Dergisi* 2002; 33: 110-118.
- 96.** Kuo YR, Wang FS, Jeng SF, Huang HC, Wei FC, Yang KD. Nitrosoglutathione modulation of platelet activation and nitric oxide synthase expression in promotion of flap survival after ischemia/reperfusion injury. *J Surg Res.* 2004 Jun 1;119(1): 92-9.
- 97.** Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function *Physiol Rev.* 2002;82(1): 47-95.37. Voogd A, Sluiter W, van Eijk HG, et al. Low molecular weight iron and the oxygen paradox in isolated rat hearts. *J Clin Invest.* 1992; 90: 2050–2055.
- 98.** Lefer DJ, Scalia R et al. Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial cell interactions and protects against ischaemia-reperfusion injury in rats. *J Clin Invest.* 1997; 4: 684-691.

- 99.** Zaccaria A, Weinzwieg N et al: Vitamin C reduces ischemia reperfusion injury in a rat epigastrik island skin flap. *Ann Plast Surg.* 1994; 33 : 620-623.
- 100.** Im MJ, Manson PN et al: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg.* 1985; 201: 357-359.
- 101.** Phillips L, Toledo AH, Lopez-Neblina F, Anaya-Prado R, Toledo Pereyra LH. Nitric oxide mechanism of protection in ischemia and reperfusion injury. *J Invest Surg.* 2009; 22: 46-55.
- 102.** McCord JM. Human disease, free radicals, and the oxidant/antioxidant balance. *Clin Biochem.* 1993; 26: 351-7.
- 103.** Schlag MG, Harris KA, Potter RF. Role of leukocyte accumulation and oxygen radicals in ischemia-reperfusion-induced injury in skeletal muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 280(4): H1716-H1721.
- 104.** Greenstock CL. Radiation and aging: Free radical damage, biological response and possible antioxidant intervention. *Med. Hypotheses* 1993;41: 473-482.
- 105.** Halliwell B: Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry and role in human disease. *Am J Med.* 1991, 91: 14-22.
- 106.** Suzuki M, Asako H, Kubes P, Jennings S, Grisham MB, Granger DN. Neutrophil-derived oxidants promote leukocyte adherence in postcapillary venules. *Microvasc Res.* 1991; 42: 125-138.
- 107.** Uysal M: Serbest radikaller, lipid peroksidleri ve organizmada prooksidan antioksidan dengeyi etkileyen koşullar. *Klinik Gelişim* 1998;11: 336-341.
- 108.** Çetinkale O, Bilgiç L, Bolayirli M et al. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg.* 1998;102: 153-160.

- 109.** Bilgin-Karabulut A, Ademoğlu, E., Aydın I et al. Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury. *J Reconstr Microsurg.* 2001;17: 425-9.
- 110.** Çetin C, Köse AA, Aral E, Çolak O, Erçel C, Karabağlı Y, Özyılmaz M, Alataş O, Eker A. Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg.* 2001 Nov;47(5): 540-6.
- 111.** Horgan MJ, Ge M et al: Role of ICAM-1 in neutrophil mediated vascular injury after occlusion and reperfusion. *Am J Physiol.* 1991; 259: L315-L319.
- 112.** Korthuis RJ, Grisham MB, Granger DN: Leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle. *Am J Physiol.* 1998; 254: H823 H827.
- 113.** Monsinjon T, Richard V, Fontaine M. Complement and its implications in cardiac ischemia/reperfusion: strategies to inhibit complement. *Fundam Clin Pharmacol.* 2001; 15: 293-306.
- 114.** Bozkurt A. K. Alpha-tocopherol (vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury. *J Cardiovasc Surg.(Torino)* 2002;43: 693-6.
- 115.** Collard CD, Lekowsky R, Jordan JE, Agah A, Stahl GL: Complement activation following oxidative stress. *Mol immunol.* 1999;36: 941-8.
- 116.** Panes J, Perry M, Granger DN: Leukocyte endothelial cell adhesion: Avenues for therapeutic intervention. *Br J Pharmacol.* 1999;126: 537-50.
- 117.** Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte endothelial adhesion molecules. *Blood* 1994; 84: 2068-2101.

- 118.** Suval WD, Duran WN et al: Microvascular transport and endothelial cell alterations precede skeletal muscle damage in ischemia-reperfusion injury. *Am J Surg.* 1987; 154: 211-218.
- 119.** Seven A, Candan G. Serbest radikaller ve lipid peroksidasyonu. *Klinik Gelişim* 1995; 8: 3906-3911.
- 120.** Uchida K. Cellular response to bioactive lipid peroxidation products. *Free Radic Res.* 2000, 33: 731-737.
- 121.** Sigurdsson GH. Perioperative Fluid Therapy In *Microvascular Surgery.* J Reconstr Microsurg. 1995;11: 57-65.
- 122.** Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M. Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature. *Int J Microcirc Clin Exp.* 1984;3:13-28.
- 123.** Longnecker DE, Harris PD. Microcirculatory actions of general anesthetics. *Fed Proc* 1980;39: 1580-3.
- 124.** Çelebi H. Serbest flep ve replantasyon cerrahisinde anestezi. *Türk Plast Surg.* 1996;4: 129-133.
- 125.** Berger A, Tizian C, Zenz M. Continuous plexus blockade for improved circulation in microvascular surgery. *Ann Plast Surg.* 1985;14: 16-9.
- 126.** Messmer K, Kreimeier U, Intaglietta M. Present state of intentional hemodilution. *Eur Surg Res.* 1986;18(3-4): 254-63.
- 127.** Barker JH, Hammersen F, Galla TJ, Bondar I, Zeller P, Menger MD, Messmer K. Direct monitoring of capillary perfusion following normovolemic hemodilution in an experimental skin- flap model. *Plast Reconstr Surg.* 1990;86: 946-54.
- 128.** Jakubowski M, Lamont A, Murray WB, de Wit SL. Anaesthesia for microsurgery. *S Afr Med J.* 1985;13;67: 581-4.

- 129.** Sessler DI. Mild perioperative hypothermia. *New Engl J Med.* 1997;336: 1730–1737.
- 130.** Nunes S, Berg L, Raittinen LP, Ahonen H, Laranne J, Lindgren L, Parviainen I, Ruokonen E, Tenhunen J. Deep sedation with dexmedetomidine in a porcine model does not compromise the viability of free microvascular flap as depicted by microdialysis and tissue oxygen tension. *Anesth Analg.* 2007;105: 666–672.
- 131.** Hahn RG. Microvascular changes and anesthesia. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46: 479–480.
- 132.** Bruegger D, Bauer A, Finsterer U, Bernasconi P, Kreimeier U, Christ F. Microvascular changes during anesthesia: Sevoflurane compared with propofol. *Acta Anaesthesiol Scand.* 2002;46: 481–487.
- 133.** Sudheer PS, Logan SW, Ateleanu B, Hall JE. Haemodynamic effects of the prone position: A comparison of propofol total intravenous and inhalation anesthesia. *Anesthesia* 2006;61: 138–141.
- 134.** Sear JW. Recent advances and developments in the clinical use of i.v. opioids during the perioperative period. *Br J Anaesth.* 1998;81: 38–50.
- 135.** Derbyshire DR, Smith G: Sympathoadrenal Responses to Anesthesia and Surgery. *Br. J. Anesthesia* 1984; 56: 725-739.
- 136.** Bozkurt M, Kulahcı Y, Zor F, Sen H, Acikel C, Deveci M, Turegun M, Sengezer M. Comparison of the effects of inhalational, epidural, spinal and combined anesthesia techniques on rat cremaster muscle flap microcirculation. *Microsurgery.* 2010; 30; 55-60
- 137.** Inberg P, Kassila M, Vilkkı S, Tarkkila P, Neuvonen P. Anesthesia for microvascular surgery in children. A combination of general anesthesia and axillary plexus block. *Acta Anaesthesiol Scand.* 1995; 39: 518–522.

- 138.** Egan TD. The clinical pharmacology of remifentanyl: A brief review. *J Anesth.* 1998;12: 195–204.
- 139.** Özköse Z, Ercan B, Ünal Y, Yardım S, Kaymaz M, Doğulu F, Paşaoğlu A. Inhalation versus total intravenous anesthesia for lumbar disc herniation: Comparison of haemodynamic effects, recovery characteristics and cost. *J Neurosurg Anesthesiol.* 2001;13: 296–302.
- 140.** Phelps DB, Rutherford RB, Boswick JA Jr. Control of vasospasm following trauma and microvascular surgery. *J Hand Surg. [Am]* 1979;4: 109-17.
- 141.** Lázár G, Kaszaki J, Abrahám S, Horváth G, Wolfárd A, Szentpáli K, Paszt A, Balogh A, Boros M. Thoracic epidural anesthesia improves the gastric microcirculation during experimental gastric tube formation. *Surgery* 2003;134:799-805.
- 142.** Bahar M, Rosen M, Vickers MD. Chronic cannulation of the intradural or extradural space in the rat. *Br J Anaesth* 1984; 56: 405–410.
- 143.** Korkut B, Alper T, Yusuf B, Gülçin T. Akciğerin İskemi-reperfüzyon hasarını engellemede teofilinin yeri ve uygun dozu. *Toraks Dergisi* 2002; 3(2): 126-131.
- 144.** Buege JA, Aust SD. Microsomal lipid peroxidation. *Meth Enzymol.* 1978; 52: 302-10.
- 145.** Jery B, Anna Jamroz W, Ewelina B, Grazyna W, Differential effect of antioxidant treatment on plasma and tissue paraoxonase activity in hyperleptinemic rats. *Pharmacological Research* 2005; 51: 523-532.
- 146.** Sevil K, Zehra A, İdris M. Multiple skleroz hastalarında serum paraoksonaz ve arilesteraz aktiviteleri ile oksidatif stresin araştırılması. *Genel Tıp Derg.* 2010;20(1):13-17.
- 147.** Cortas NK, Wakid NW: Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method. *Clin Chem.* 1990;36 (8Pt):1440-1443

- 148.** Erel O. (2004). A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation, *Clin Biochem.* 37: 277–285.
- 149.** W. O. Carter, C. Bull, E. Bortolon, L. Yang, G. J. Jesmok, R. H. Gündel. A murine skeletal muscle ischemia- reperfusion injury model: differential pathology in BALB/c and DBA/2N mice. *J Appl Physiol* 85: 1676-1683, 1998.
- 150.** Pernow J, Wang QD. The role of the L-arginine/nitric oxide pathway in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Acta Physiol Scand.* 167(2) 151-159, 1999.
- 151.** Flaherty JT, Weisfeldt ML. Reperfusion injury. *Free Radic Biol Med.* 5(5-6): 409-419, 1988.
- 152.** Albrecht EW, Stegeman CA, Heeringa P, Henning RH, van goor H. Protective role of endothelial nitric oxide synthase. *J Pathol.* 199 (1): 8-17, 2003.
- 153.** Hernandez-Pando R, Schon T, Orozco EH, Serafin J, Estrada-Garcia I. Expression of inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine during evolution of experimental pulmonary tuberculosis. *Exp. Toxicol. Pathol.* 53(4): 257-265, 2001.
- 154.** Um SC, Suzuki S, Toyokuni Kim BM, Tanaka T, Hiai H, Nishimura Y. Involvement of nitric oxide in survival of random Pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 101(3): 785-792, 1998.
- 155.** Miller NJ, Rice-Evans C, Davies MJ, Gopinathan V, Milner A. A novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring the antioxidant status in premature neonates. *Clin Sci.* 1993; 84:407-12.
- 156.** Rice-Evans, C, Miller N.J. (1994). Total antioxidant status in plasma and body fluids, *ethods. Enzymol.*, 234: 279-293.
- 157.** Re R, Pellegrini N, Proteggente, A, Pannala, A, Yang M, Evans CR (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Rad Biol Med.* 26 (9/10): 1231-1237.

