

T.C.
ADNAN MENDERES ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
GENEL CERRAHİ ANABİLİM DALI

RATLARDA ASKORBİK ASİDİN KOLON ANASTOMOZU
İYİLEŞMESİNDEKİ ETKİLERİ

UZMANLIK TEZİ
DR. FEHMİ CEYLAN

TEZ DANIŞMANI
PROF. DR. ŞÜKRÜ BOYLU

AYDIN 2006

TEZ ONAY SAYFASI

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Genel Cerrahi Anabilim Dalı araştırma görevlisi **Dr. Fehmi Ceylan**'ın "*RATLARDA ASKORBİK ASİDİN KOLON ANASTOMOZU İYİLEŞMESİNDEKİ ETKİLERİ*" konu başlıklı, Prof. Dr. Şükrü Boylu'nun danışmanlığını yaptığı tez çalışması 12. Temmuz. 2006 tarihinde jürimiz tarafından incelenmiştir. Jüri üyelerinin görüşleri aşağıda belirtilmiştir.

Jüri Üyesi	Görüş	
	<u>Başarılı</u>	<u>Başarısız</u>
Prof. Dr. Şükrü BOYLU (Başkan)		
Doç. Dr. Ahmet Ender DEMİRKIRAN		
Yrd. Doç.Dr. Hakan ERPEK		
Doç. Dr. Haluk EROL		
Doç. Dr. Mehmet DÜNDAR		

İÇİNDEKİLER

	Sayfa
KISALTMALAR	4
1. GİRİŞ VE AMAÇ	5
2. GENEL BİLGİLER	6
2.1 Yara İyileşmesi	6
2.2 Barsakta Anastomotik İyileşme	8
2.2.1 Mukozal İyileşme	10
2.2.2 Submukozal ve Serozal İyileşme	10
2.2.3 Gastrointestinal İyileşmeyi Etkileyen Faktörler	11
2.3 Anastomoz İyileşmesini İnceleme Yöntemleri	14
2.3.1 Mekanik İnceleme Yöntemleri	14
2.3.2 Biyokimyasal Yöntemler	15
2.3.3 Histopatolojik Değerlendirme	16
2.4 Askorbik Asitin Barsak Anastomozu İyileşmesindeki Rolü	16
2.4.1 Askorbik Asitin Biyokimyası	16
2.4.2 Askorbik Asit ve Kollajen Metabolizması	17
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1 Patlama Basıncı Ölçümü	20
3.2 Hidroksiprolin Düzeyi Ölçümü	22
3.3 Histopatolojik Çalışma	23
4. BULGULAR	24
4.1 Anastomoz Patlama Basınçları	24
4.2 Doku Hidroksiprolin Düzeyleri	25
4.3 Histopatolojik İnceleme Skorları	26
4.4 Grupların Ortalama Makrofaj, Fibroblast ve Neovaskülarizasyon Skorlama Değerleri	27
5. TARTIŞMA	29
6. SONUÇLAR	33
7. ÖZET	34
8. SUMMARY	35
9. KAYNAKLAR	36

KISALTMALAR

TGF- β	Transforming growth factor beta
PDGF	Platelet- derived growth faktör
PF4	Platelet factor 4
PAF	Platelet activating faktör
C5a	Kompleman 5a
IL-1	Interlökin 1
IL-8	Interlökin 8
TNF- α	Tümör nekroz faktör alfa
FGF	Fibroblast growth faktör
EGF	Epidermal growth faktör
PMNL	Polimorfo nükleer lökosit
nmol	Nanomol
μ mol	Mikromol
μ L	Mikrolitre
SF	Serum fizyolojik
Preop.	Preoperatif
Postop.	Postoperatif

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Gastrointestinal cerrahi'nin en temel girişimlerinden olan “barsak anastomozu”, gerek iyileşme süreci, gerekse de neden olduğu morbiditelerle araştırmacıların en çok ilgilendiği konulardan biri olmuştur. Barsak anastomozu çok sık uygulanmasına ve bu konudaki yoğun deneyim birikimine rağmen, anastomoz kaçağı halen % 0-35 sıklıkta ortaya çıkmaktadır (1). Hastada ciddi morbiditeye neden olan kaçaklar, büyük oranda anastomozun anal verge olan mesafesine, operasyon tipine ve cerrahın tecrübesine bağlı olarak % 2-19 oranları arasında değişmektedir (2,3,4,5). Kaçak sonrası mortalite sıklığı ise (%25-50) tüm yandaş tedavilere rağmen çok yüksektir (4). Mortalite ile sonuçlanmayan olgularda bile ortaya çıkan ciddi morbidite yaşam kalitesinde bozulmaya, hastanede kalış süresinde artışa neden olmaktadır (6,7).

Kolon anastomozunun iyileşme sürecinde; cerrahi teknik, anastomoz hattındaki kanlanma ve oksijenizasyon, sütür materyelleri, kan transfüzyonu, radyasyon terapisi, mekanik barsak hazırlığı, yandaş hastalıklar (ör: diyabet), ilaç tedavileri, beslenme , yaş, yeterli drenaj ve antibiyotik uygulamaları, anastomoz gerginliği gibi pekçok faktör etkilidir (8,9). Doku düzeyinde ise, kolon anastomozunun iyileşme sürecindeki başarı, anastomoz hattına doğru olan kollagen göçü ile çok yakından ilgilidir (10,11,12,13,14).

Çalışmamızda, doğal antioksidan, antiinflamatuvar etkinliği ile kollajen metabolizmasını destekleyerek yara iyileşmesini olumlu yönde etkilediği saptanan askorbik asitin, deneysel kolon anastomozunun iyileşme sürecindeki doza bağımlı etkisini araştırdık.

2. GENEL BİLGİLER

2. 1. Yara İyileşmesi

Yara iyileşmesinin cerrahi yönden önemli aşamaları şöyle sıralanabilir;

1. Hemostaz ve inflamasyon
2. Proliferasyon (fibroplazi)
3. Olgunlaşma ve yeniden yapılanma

Bu aşamaları kısaca aşağıdaki gibi detaylandırabiliriz:

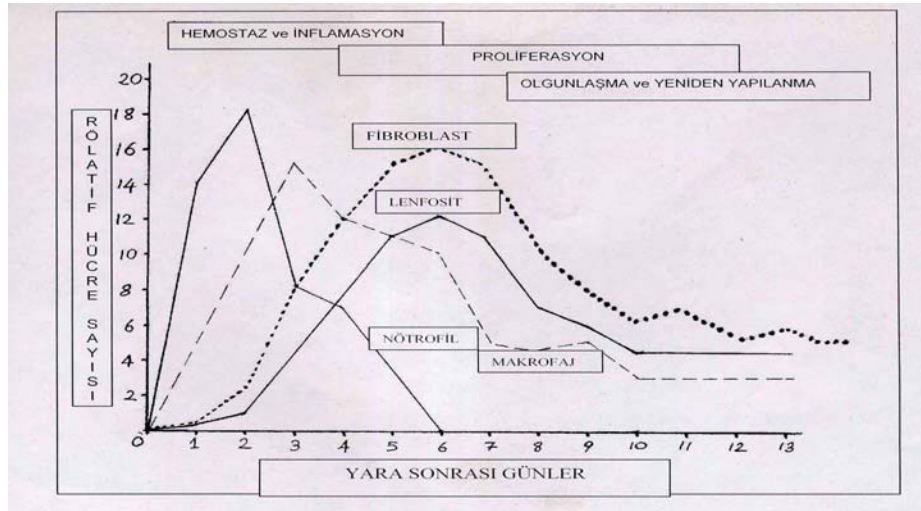
1) Hemostaz ve inflamasyon fazı: Yaralanma sonucu yırtılmış damarlarda vazokonstriksiyon meydana gelir ve koagülasyon kaskadı başlar. Trombosit α granüllerinin degranüle olması ile fazla miktarda transforming growth factor β (TGF- β) salınır. TGF- β , makrofaj ve lenfositlerin kemotaksisini hızla uyarır. Lenfositler ve monositler de, PDGF, TGF- β , PF4, kompleman, protein C5a, lökotrien B₄ ve PAF gibi diğer trombosit kökenli yangı hücreleri tarafından yaraya çekilirler. Trombositlerin subendotelial kollagen ile teması sonucu intrinsik koagülasyon kaskadı başlar. Oluşan pıhtı nötrofil, monosit ve fibroblast gibi hücrelerin yara ortamında toplanması için bir ağ gibi görev yapar. Hemostazı takiben plazma ve doku kaynaklı enflamasyon mediatörleri (histamin, serotonin, prostaglandinler gibi) vazodilatasyon ve permeabilitede artışa neden olur. Yara ortamından salınan kemotaktik ajanlar (kompleman faktörleri, IL-I, TNF- α , TGF- β , trombosit faktör IV ve bakteriyel ürünler gibi) hücre migrasyonunu stimüle eder. Nötrofiller yaraya doğru göç eden ilk hücre grubudur. FGF ve PDGF nötrofillerin yaraya infiltrasyonunu uyarır. İnflamasyon süresince nötrofiller, makrofajlar ve lenfositler baskın durumdadır. Yara alanına olan hücre kemotaksisini hücrelerin fonksiyonel aktivasyon kazanması takip eder. Bunun sonucunda sitokinler ve büyüme faktörlerinin üretim ve salınımında artma olur. Aktive olan makrofajlar, debridman, matriks sentezi ve anjiogenez gibi yara iyileşmesini bir çok yönden ilgilendiren önemli görevleri yerine getirir. Başlangıçta trombositlerden salınan faktörler makrofaj aktivasyonu

için ilk ve gl bir uyarım sağlar. Fibronektin ve kollagen gibi bazı hücresel ürünlerin fagositozu da makrofajların aktivasyonunu şiddetlendirir ve sitokinler salgılar (15,16,17).

2) Proliferasyon fazı: Fibroblastik proliferasyon, transforming growth factor β (TGF- β) ve interleukin 1 (IL-I) ile stimüle edilir. Anjiogenez epidermal growth factor (EGF) ve IL-8 ile aktive edilir, nötrofillerin yaraya infiltrasyonu TNF- α ve neutrophil-activating peptide-II (NAP-II) ile tetiklenir (17). Fibroblastlar ve endotelial hücreler bu faz sırasında proliferen olan temel hücrelerdir. Fibroblastlar yaraya evre dokulardan g ederler. ve büyüme faktörlerinden bazıları, (r: PDGF, EGF) fibroblastların kemotaksisini tetiklerler.

Kollagen sentezi için lizin ve prolinin hidroksilasyonu gereklidir. Hidroksilasyon için kullanılan kofaktörler ise ferröz demir , moleküler oksijen, alfa-ketoglutarat ve askorbik asittir (18). İntakt venüllerden endotelial hücre proliferasyonu sonucu yeni kapiller damarlar yara alanı içine doğru ilerler (neovaskülarizasyon).

3) Olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazı: Bu fazın en önemli özelliği yarada kollagenin yıkım ve sentezinden sorumlu olan, kollagenaz aktivitesi sitokinlerin sıkı kontrolü altındadır. (19,20). Kollagen yıkımı iyileşmenin erken dönemlerinde başlar ve özellikle hemostaz ve inflamasyon fazında iyice hızlanır. Yaradaki kollagenaz kaynakları inflamatuvar hücreler, endotel hücreleri, fibroblastlar ve keratinositlerdir. Yara iyileşmesinde zamana bağlı olarak değişiklikler gösteren rölatif hücre sayıları sekil 2.1’de gösterilmiştir. Olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazı 1 yıla kadar sürer (21).



Şekil 2. 1 Yara İyileşmesinde Zamana Bağlı Değişiklikler

2.2 Barsakta Anastomotik İyileşme

2003 yılında ABD’de yaklaşık 5 milyon sindirim sistemi operasyonu kayıtlara geçmiştir. Bu kayıtlara göre, özefagus ve kolorektal operasyonlarda halen %10–20 oranında anastomoz kaçağı görülmektedir (18). Kolon cerrahisindeki mortalite ve morbidite oranlarının yüksekliği araştırmacıları anastomoz iyileşmesi ile ilgili çeşitli çalışmalar yapmaya yönlendirmiştir.

Gastrointestinal kanal cerrahi uygulamalarda sıklıkla müdahale edilen bölgelerden biridir. Gastrointestinal kanal histolojik olarak mukoza, submukoza, müskülaris propria ve serozadan oluşan ve her biri farklı işlevleri olan hücre tiplerinin oluşturduğu 4 tabakadan oluşur.

Tüm dokularda zedelenme sonrası hemostaz ve inflamasyon, proliferasyon, olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazları ortak olmasına karşın tüm dokular aynı şekilde iyileşmemektedir. Barsaktaki iyileşmede birçok farklılıklar olup bunlar iyileşmenin hızını ve sonucunu etkilemektedir (8,22,23,24);

1. Normal şartlarda gerilme kuvveti, cilt yaralarına göre barsakta çok daha hızlı kazanılmaktadır.

2. Cilt yaralarının aksine barsak yaralarında fibroblastlara ek olarak düz kas hücreleri de kollagen sentezler.

3. Cilt ve barsak yaralarında fibroblastlardan kollagen sentezi farklı mekanizmalarla düzenlenir.

4. Barsaktaki iyileşmeye mukoza, submukoza ve serozal katmanların katkısı da farklıdır.

5. Gastrointestinal kanalda lümenin içerdiği geniş mikroorganizma havuzu, sütür hattının kapatılmasında serozanın etkisi, hipovolemi durumunda perfüzyonu tercihen azalan özel damarsal beslenme gibi diğer bir çok farklı özellikler mevcuttur.

Barsağa insizyon yapıldığında başlangıçta bir hemostatik vazokonstrüksiyon olur ve hemen ardından kininlerin indüklediği bir vasküler geçirgenlik artışı görülür. Sütür konurken buna dikkat edilmelidir. Çünkü dokular ödemli iken konulan sütürlere bağlı strangülasyonun bir sonucu olarak doku nekrozu gelişebilmektedir (8). Yaralanmadan 3 saat sonra nötrofiller bağırsaktaki insizyon yerine göç eder. Bu göç 12-24 saatte en üst düzeye ulaşır. Monosit ve fibroblastlar 24-48 saat sonra insizyon alanında görülür. Nekrotik dokunun enzimatik parçalanması ve kollagen yıkımı oluşur. Kollagen proteinazlar, elastaz, katapsin G ve nötral proteinazlarca yıkılır. Yine cerrahi travmaya bağlı gelişebilen lokal inflamatuvar reaksiyon kollagen yıkımına yol açabilir (25). Bu inflamatuvar reaksiyon 7 gün sürer (26). Fibroblastlar 2. günde kollagen sentezlemeye başlar. Kollagen yapımı ancak postop 3-5. günde kollagen yıkımını geçer. Erken dönemde kollagen sentezinin spesifik bir segment lokalizasyonu olmaksızın artmasının operasyon travmasına bağlı bir genel reaksiyon olduğu ifade edilmektedir. Sonraki günlerde anastomoz hattında kollagen artışı ise anastomoz iyileşmesinin işaretidir (25,27,28,29). Anastomoz çevresindeki barsağın submukozasında ve anastomozun onarım dokusunda 5. günden sonra hakim olduğu gözlenen hücre tipi fibroblasttır (14). Dokunun gerilim kuvveti ise günler içerisinde belirgin değişiklik göstermektedir; ilk üç gün

zarfında azalırken postop 3-5. günde yeniden eski durumuna gelir (26). Anastomoz bölgesinde görülen granülasyon dokusu iyileşmenin proliferasyon safhasının başladığını gösterir (8).

2. 2. 1. Mukozal İyileşme

Barsak epiteli, başta kolumnar hücreler (enterosit ve kolonositler) olmak üzere goblet hücreleri, daha az oranda entero-endokrin ve Paneth hücreleri ile diğer küçük hücre grupları gibi değişik epitelyal hücre topluluklarından oluşur. Barsak mukozal yüzeyi, yaşam boyu devam eden hızlı bir döngüye sahiptir. Vücudun en hızlı hücre döngüsü ince ve kalın bağırsak epitel yüzeyinde her 24-96 saatte bir gerçekleşir. Barsağın tek tabakalı epiteli mikroorganizmalar, antijenler, diyet maddeler ve sindirim enzimi karışımlarından oluşan karmaşık dış ortama karşı bir bariyer görevi görür (30,31).

Gastrointestinal kanaldaki epitelyal hasarların en az üç farklı yoldan tamir edildikleri gösterilmiştir. Birincisinde canlı epitel hücrelerinin hasarın komşuluğundaki bölgeden hasarlı bölgeye doğru göçerek lezyonu örter. In vivo ve in vitro olarak gerçekleşen bu olay mukozal yeniden yapılanma olarak isimlendirilmektedir ve daha derin mukozal hasarlanmayı önleyen ilk mekanizmadır(32). Mukozal yeniden yapılanma ile epitel devamlılığı hücre çoğalması için gerekenden çok az bir süre olan dakikalar ya da saatler içinde tamamlanabilir. İkinci yol ise yüzey epitel devamlılığının tekrar yapılandırılmasından sonra hücre proliferasyonu ile kaybedilen hücrelerin yerine konmasıdır. Bu olay hasarlanmadan 12-16 saat sonra başlar ve birkaç gün içinde tamamlanır (32,33-38).

Üçüncü olay ise undiferansiye epitel hücrelerinin diferansiasyonu ve maturasyonudur. Bu diferansiasyonu ve maturasyon mukozal epitelin çeşitli fonksiyonel aktivitelerinin idanmesi için gereklidir (32).

2. 2. 2. Submukozal ve Serozal İyileşme

Submukoza bağırsağın daha çok bağ dokusu ve damarlardan oluşan farklı bir tabakasıdır. Gastrointestinal kanalda kollagenin en çok bulunduğu ve barsağın yapısal

bütünlüğünün sağlandığı yerdir. Ciltten oldukça farklı olarak %68 tip I, %20 tip III ve %12 tip V kollagen içerir (39). Barsak düz kas hücrelerinin tip V kollageni bağlayan reseptörlerinin olması bu tabakada bulunan kollagenin mükölaris mukoza ve mükölaris propriadaki düz kas hücreleri tarafından salgılandığını göstermiştir (40). Submukoza sağlam barsaktaki gerilim kuvvetinin en önemli kaynağı ve anastomotik uçları bir araya getiren sütürlerin tutunduğu başlıca katmandır (8). Olgunlaşma ve yeniden yapılanma fazında anlatıldığı gibi yara iyileşmesi primer olarak kollagen depolanması ile ilgilidir. Aynı şekilde, bağırsak anastomozlarının iyileşme periyodunda da en önemli faktör anastomozdaki kollagen miktarıdır. Anastomozlardaki iyileşmenin ilk günlerinde hidroksiprolin düzeylerinde %20'ye varan azalma görülür (41,42) ve 3. ve 4. günde anastomoz gerginliğinde progresif bir azalma olur (43). Üç-dört gün sonra yara bölgesinde kollagen yapımı ve birikimi belirginleşmeye başlar. Kollagen miktarındaki artışla birlikte anastomoz kuvvetinde de artış meydana gelir. Yapılan deneysel çalışmalarda intestinal anastomoz sonrası 2. günde protein sentezinde artma olduğu, tüm segmentlerde kollagen miktarında artış olduğu, postop 4-7 günler arasında ise kollagen birikiminin en fazla anastomoz segmentinde olduğu gösterilmiştir (8,25,44).

2.2.3.Gastrointestinal İyileşmeyi Etkileyen Faktörler

Kollagen yıkım ve sentezini dengeleyen lokal ve sistemik faktörler olarak bir çok iç ve dış faktör kolon anastomozlarında iyileşmeyi etkiler (18,45,46). Anastomoz bölgesinin kan akımı ve oksijenizasyonu ve cerrahi teknik en önemli faktörlerdir (8). Oksijen, askorbik asit gibi kollajen sentezinde kullanılan lizin ve prolinin hidroksilasyonu için gereklidir (18). Matür kollajen oluşumu pO₂ 40mmHg nin altına düştüğünde bozulur. 10 mmHg'nin altında ise büyüme faktörleri, damarlanma ve epitelizasyon zarar görür. Anemi, perfüzyon yeterli olduğu sürece yara iyileşmesine zarar vermez. Hastalarda kardiyak output yeterli oldukça ve periferik vazokonstriksiyon olmadıkça, normal değerlerin %15 aşağısına kadar hematokrit değerleri tolere edilebilir (47,48,49,50).

Anastomoz yapılırken barsağın aşırı ve kaba mobilizasyonu beslenmede kritik damarlara zedeleyerek anastomozun bütünlüğüne zarar verebilir(51).Yetersiz mobilizasyon nedeniyle gergin anastomozlarda ise azalmış perfüzyona bağlı inflamatuvar hücre infiltrasyonunda azalma görülür (52). Gerilime bağlı lokal mikrodolaşımın azalmasının en az tolere edildiği yer kalın barsaktır (8).

Lokal enfeksiyon inflamatuvar fazı uzatarak ve doku proteazlarının salgılanmasının artışı uyararak yara iyileşmesini olumsuz yönde etkiler. Doku proteaz larındaki artış büyüme faktörlerinin yıkılmasına neden olur ve böylece epitelizasyonda ve kollajen birikiminde gecikme ortaya çıkar (47).Kan transfüzyonları immun yanıtı baskılar ve tümör gelişiminde ve tümör nüksü oranında artma, transplant işlemlerinde allogreft canlılığında uzama ve enfeksiyona yatkınlıkta artma ile sonuçlanır. Kolon anastomozu iyileşmesini bozup intraperitoneal sepsis insidansını da arttırırlar. Kan transfüzyonunun iyileşmeye olumsuz etkisinin peritoneal sepsiste artışa bağlı olarak mı, yoksa iyileşme sürecinde direkt bozulmaya yol açarak mı olduğu açık değildir (8).

Hayvan modellerinde uygulanan lokalize preop. ve periop. barsak radyoterapisinin yara iyileşmesiyle uyumlu olmadığı gösterildi. Eğer makrofaj göçünden önce radyoterapi uygulanırsa , normal yara iyileşme kaskadının oluşacağı ileri sürüldü (8,53). Yara iyileşmesi için enerjiye ve hastanın yeterli beslenmesine ihtiyaç vardır. Hastanın malnütre olması, onarım için gerekli olan vitamin ve minarellerde yetersizliğe yol açtığından, yara iyileşmesinde problemler için predispozandır. Bunlar çinko ve bakır gibi kollajen sentezi ve çapraz bağlar için gerekli olan A, C ve B6 vitaminleridir (47,54).

Yaşlı hastalar genç hastalara göre daha fazla anastomoz ayrılmasına eğilimlidirler; bu malnütrisyon,jeneralize ateroskleroz, kardiyak ve respiratuvar dekompanseasyon gibi sistemik bozukluklara ve kullanılan ilaçlara bağlanmaktadır (55,56). Stoop ve arkadaşları (57) sıçan

modellerinde yaptıkları iyi hazırlanmış bir çalışmada, ileri yaşın tek başına ileal ve kolon anastomozlarında kollajen içeriğini ve dayanıklılığını etkilemediğini gösterdiler.

Kortikosteroid uygulaması ise bu kadar açık sonuçlar vermedi. Mastboom ve arkadaşları (58) metilprednisolon alan sıçanlardaki ileal ve kolon anastomozlarında kollajen içeriği ve anastomoz dayanıklılığında bir azalma olmadığını saptadılar. Furst ve arkadaşları da (59) deneysel bir çalışmada, postop 4. günden sonra patlama basınçlarında azalma saptadılar. Barsak temizliğinin etkisiyle ilgili Slim ve ark. (60) tarafından yapılan metaanalizde, elektif kolorektal cerrahi öncesi ihmal edilmiş barsak temizliğinin postop. anastomoz kaçağı oluşumunda etkisinin olmadığı; üstelik subgrupların analizinde polietilen glikol ile yapılan mekanik barsak temizliğinin anastomoz kaçağı riskini arttırdığı sonuna ulaşıldı. Sözü edilen metaanalizde yer almayan iki randomize çalışma da bu bulguları desteklemekteydi (61,62).

Sıçanlarda yapılan kolon anastomozlarında; vitamin eksikliğiyle birlikte protein eksikliğinin de anastomoz patlama basıncını azalttığı gösterilmiştir (63,64). Her iki teknikte de anastomozu tehlikeye sokabilecek potansiyel zayıflıklar olmakla birlikte, cerrahlar arasında teknik seçiminde fikir ayrılıkları vardır. İki kat anastomoz mantıklı görünmesine ve başta ek dayanıklılık sağlamasına rağmen, fazla sütür materyali kullanımı ve içe döndürülen dokuda iskemi oluşturmaları nedeniyle iyileşmenin erken evrelerinde yangısal yanıtı artırır. Böylece iyileşmenin yangısal fazında daha fazla kollajen yıkılır ve sonuçta zayıf bir anastomozu yol açar. Tek tabaka anastomozu savunanlar doku kenarlarına daha az hasar vererek, daha geniş bir lümen sağlandığını iddia etmektedirler (8,45,65,66).

Leslie ve arkadaşları, aralıklı serosubmukozal yapılan anastomozun altın standart olduğunu söylemişlerdir (67). Gİ traktüste emilmeyen monoflaman dikiş materyalleri başarılı anastomoz iyileşmesi sağlamada ideale en yakın olanlardır. Cerrahi staplerlerde kullanılan paslanmaz çelik minimal doku reaksiyonuna neden olur. Bir multiflaman sütür materyali olan

poliglikolik asit'in yıkım ürünleri antibakteriyeldir (68).

İntestinal anastomozda cerrahi tekniğe bağlı hatalar 4. ve 7. günlerde kaçak riskini arttırır. Ancak artmış kollajen sentezinin bozulması veya çeşitli nedenlerle bloke edilmesi daha sonraki günlerde ortaya çıkan kaçaklara da neden olur. Gerilim kuvveti ve ayrılma direncinin artmasında en önemli faktör, ihtiva ettiği kollajen miktarından daha çok mevcut kollajenin intramoleküler ve intermoleküler kovalen bağlarının artmasıdır (69).

2.3 Anastomoz İyileşmesini İnceleme Yöntemleri

Anastomoz iyileşmesinin parametreleri mekanik, biyokimyasal ve histolojik olarak incelenebilir.

2.3.1 Mekanik İnceleme Yöntemleri

a) Anastomoz patlama basıncı

Patlama basıncı, artan intraluminal basınca karşı duvar direncini gösteren bir parametredir. Bu yöntemin esası, patlama basıncı ölçülecek barsak parçasının su banyosu içerisinde hava veya boya ilave edilmiş sıvı ile şişirilmesi ve manometre aracılığı ile basıncın kaydedilmesidir. Bu yöntemin kullanımının Clumsky'e dayanan 90 yıllık bir geçmişi vardır. İntرالuminal basıncın uygun hızda arttırılmasının (2-12 ml H₂O/dk) sonucu daha güvenilir kıldığı saptanmıştır. Bu parametre kullanılarak yapılmış birçok deneysel çalışma incelendiğinde, patlama basıncı değerlerinin çalışmalar arası kıyaslamaların uygun olmadığı sonucuna varılmıştır. Çalışmalardaki patlama basınçları ancak aynı çalışmanın kontrol grubu ile kıyaslandığında anlamlı ve güvenilir değerlendirmeler yapılabilmektedir. Literatürde belirli bir modelde (enfeksiyon, lavaj, nutrisyon vs.) ve belirli bir segmentte (ileum, çıkan kolon, sigmoid vs.) yapılmış anastomozlar için birer ortalama değer vermenin doğru olmayacağı gösterilmiştir(45,70).

b) Kopma Direnci (Ayrılma Kuvveti)

Barsak segmentinin uzun eksenine paralel olarak kesip çıkartılan bir barsak şeridinin iki ucuna zıt yönde uygulanan ve kopmaya yol açan kuvvettir. Bu işlem ölçüm için geliştirilen “*tensiometer*” (gerilim ölçer) cihazı ile yapılmaktadır. Postoperatif 4. Günden itibaren başlayan yeni kollajen sentezi ile paralellik gösterir. Anastomozdan 10 gün sonra anastomozun kopma direnci, opere edilmemiş kolonun yaklaşık % 50’sidir. Patlama basıncından daha yavaş olarak yeniden kazanıldığı için yara iyileşmesinin geç dönem belirticidir. Bu yöntem, uygulanan kuvvetin tüm duvara eşit olarak dağılmasının mümkün olmayacağı varsayılarak birçok araştırmacı tarafından eleştirilmiş ve güvenilir kabul edilmemiştir (70).

2.3.2 Biyokimyasal Yöntemler

Anastomoz iyileşmesinin biyokimyasal parametresi kollajen konsantrasyonudur. Kollajen submukozal dokudadır ve barsak duvarının devamlılığını ve mekanik kuvvetini oluşturur. Hidroksiprolin omurgalıların dokularında hemen hemen yalnızca kollajende (kollajende % 14 ve elastinde % 2) bulunur, diğer hayvan proteinlerinde önemli miktarda yoktur. Hidroksiprolin dağılımının tek tipliliği; bu aminoasidi iyileşme sürecinin gözlenmek istendiği dokulardaki kollajen metabolizması çalışmalarında yararlı bir belirteç yapar (50). Hidroksiprolin düzeyi birim yaş dokuda ağırlık olarak ($\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş doku) verilmektedir. Bu değer nonkollajenöz matriks materyallerini de içermektedir. Ancak bu ihmal edilebilir bir değerdir ve hidroksiprolin düzeyinin bire bir kollajen içeriğini yansıttığı kabul edilmiştir. Anastomoz iyileşmesinde kollajen içeriği kadar kollajenin kalitesi ve çaprazlaşma yeteneği de önemlidir; ancak bunu direkt olarak belirleyen bir yöntem yoktur(45,70).

Gastrointestinal sistemde yara iyileşmesini değerlendiren bir diğer biyokimyasal yöntem de intramural pH ölçümüdür. Teknik olarak zor olmasına rağmen anastomoz

bölgesinin kanlanması ve dolayısıyla yara iyileşmesi açısından kantitatif veriler elde edilebilir (70).

2.3.3 Histopatolojik Değerlendirme

İnflamatuar göç, nekrozun derecesi, kapiller ve mukozal onarımın durumu semikantitatif olarak belirlenmiş ve çeşitli skorlamalara tabi tutularak anastomoz iyileşmesinin belirteci haline getirilmiştir. Nekrozun ve inflammatuar göçün fazla oluşu granülosit kökenli kollajenaz aktivitesinin artması ve dolayısıyla daha zayıf iyileşme ile sonuçlanmaktadır (71).

2.4 Askorbik asitin barsak anastomoz iyileşmesindeki rolü

Askorbik asit, biokimyasal olarak tanımlandığından bu yana, yaşamsal fonksiyonlarda oynadığı kilit roller ile gündemde kalmıştır. İlk olarak 18. yüzyılın ortalarında James Lind taze turunçgil suyunun skorbütü iyileştirdiğini kanıtlamıştır. Bu aktif ajan askorbik asit 1920'lerin sonlarında Albert Szent-Gyorgyi tarafından izole edilmiş ve 1930'ların ortalarında askorbik asit sentezleme yöntemlerinin bulunmasıyla, askorbik asit ucuz ve yaygın hale gelmiştir. 1990'larda ise ABD'de en yaygın kullanılan, beslenmeye katkı maddesi olmuştur (72).

2.4.1 Askorbik Asit'in Biyokimyası

Diyetle alınması zorunlu olan askorbik asit, başlıca duodenum, proksimal duodenum ve ağız mukozasından olmak üzere mide-barsak kanalından aktif transportla kolayca emilir, daha sonra böbreklerden de reabsorbe olur. Böbreklerden atılımında tıpkı glukoz gibi eşik değeri olduğu için bölünmüş dozlarda alınması faydalıdır, yarılanma ömrü 16 gün olarak hesaplanmıştır (73). Kimi çalışmalarda vücuttaki depoyu korumak için 100 mg/gün veya daha fazla gereksinim olduğu gösterilmiştir (74).

Askorbik asit, canlı dokuda görülen en önemli indirgeyici ajanlardan biridir. Askorbat hidroksilaz enzimlerinin metal iyon şeklindeki kofaktörlerine elektron vererek hidroksilasyon

reaksiyonlarını hızlandırır. Hidroksilasyon reaksiyonları; kollagen sentezinde, lizinin karnitine dönüşümünde, dopaminin norepinefrine dönüşümünde ve tirozin metabolizmasında kullanılır. Amidasyon reaksiyonlarında katalizör olarak da kullanılır. Askorbik asit, nötrofillerin üretimini stimüle eder ve interferon, antikor üretimini arttırarak immun sisteme yardımcı olur. Askorbik asit moleküler oksijen, hidroksil ve süperoksit radikalleriyle doğrudan reaksiyona girerek zincir kıran bir antioksidandır (75).

2.4.2 Askorbik asit ve Kollagen Metabolizması

Askorbik asit, bağ dokusunun üretimi ve korunmasında başlıca rolü oynar ve karmaşık matriks yapıyı birarada tutar. Kollagenler direnci sağlayan fibröz yapısal proteinlerdir. Bazı kolagen tipleri (Tip I, III ve IV) üçlü heliksler halinde lateral çapraz bağlanan fibriller oluşturur. Fibriller kollagenlerin direnci askorbik aside bağımlı çapraz bağlardan gelir (76). Bu da molekülün en iyi konfigürasyona ulaşmasını sağlayan ve dayanıklılığını arttıran hidroksilasyon reaksiyonu ile olur. Prolinin hidroksilasyonundaki eksiklik unstabil kollagen moleküllerinin oluşmasına neden olur ki, bunlar intrasellüler veya ekstrasellüler ortamda hızlı bir şekilde yıkılırlar. Hidroksilasyon basamağındaki anahtar çok miktarda hidroksiprolin ve kosubstratın gerekli olmasıdır. Askorbik asit ya da moleküler oksijen eksikliğinde öncelikle kollagen üretiminde ve sonuç olarak da yaranın güçlenmesinde yetersizlik olur (77). Bunun ötesinde, son zamanlarda elde edilen kanıtlar, askorbik asidin prokollagen messenger RNA seviyesini arttırdığını göstermektedir. Gaby ve Sing'in (78) açıklamalarına göre kollagen subünitleri, fibroblastlar içinde prokollagen olarak oluşturulur ve ekstrasellüler aralığa salgılanır. Askorbik aside prokollagen moleküllerinin hücre dışına taşınmasında ihtiyaç vardır. En sonunda prokollagen enzimatik olarak ikiye bölünmesinden sonra kollagen oluşur.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Araştırmamız Adnan Menderes Üniversitesi Veterinerlik Fakültesi Deney Hayvanları Laboratuvarı'nda, Üniversite Yerel Hayvan Etik Kurulu onayı alınarak yapıldı. Çalışmada 30 adet, ağırlığı 170–220 gr arasında değişen, dişi Wistar Albino ratlar kullanıldı. Ratlar 2'şerli kafeslerde tutuldu. Institue of Laboratory Animal Resources (ILAR) tarafından 1996 yılında yayınlanan rehbera uygun olarak bakım ve araştırma koşullarında tutuldu. Ratlar üç gruba randomize edildi;

Grup I (Kontrol): Kolon anastomozunun ardından 7 gün süre ile intramusküler SF verildi. Yedinci gün ratlar sakrifiye edildi ($n=10$).

Grup II: Kolon anastomozunun ardından 7 gün boyunca intramusküler yolla askorbik asit (100 mg/kg) verildi. Yedinci gün sakrifikasyon uygulandı ($n=10$).

GrupIII: Kolon anastomozunun ardından 7 gün boyunca intramusküler yolla askorbik asit (200 mg/kg) verildi. Yedinci gün sakrifikasyon uygulandı ($n=10$).

Ratlar *ad libitum* olarak beslendi ve postoperatif dönemde ağırlarını azaltmak amacıyla, sularına 2 mg/kg olacak şekilde parasetamol eklendi ve sakrifikasyona kadar sürdürüldü. Tüm ratların operasyondan 12 saat önce pelet diyeti kesildi, ancak su kısıtlaması uygulanmadı. Anestezi 40 mg/kg ketamin hidroklorür (*Alfamin, Egevet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti*) ve 8 mg/kg xylazin (*Alfazin, Egevet Hayvancılık San. ve Tic. Ltd. Şti*) karışımı ile intraperitoneal enjeksiyon yolu ile uygulandı. Anestezinin ardından karın cildi traş edildi. Grup II ve Grup III'te yer alan ratlara sırasıyla 100 mg/kg ve 200 mg/kg dozlarında im. askorbik asit yapıldı. Karın cildi polyod (%10 polivinilprolidon iyot kompleksi) ile boyandı. Steril ortamda 3 cm'lik orta hat insizyonu ile karına girildi (Resim 3.3.1).



Resim 3.3.1

Karına girilmesini takiben çekum bulundu ve ileoçekal bileşkenin yaklaşık 4 cm distalindeki kolon segmentine,mezosuzarar görmeyecek şekilde tam transeksiyon uygulandı.(Resim 3.3.2)



Resim 3.3.2

6/0 poliglactin 910 (vicryl Ethicon) ile tek tabaka evert edici sütürlerle u-uca anastomoz yapıldı (Resim 3.3.3).



Resim 3.3.3

Tüm anastomozlar tek cerrah tarafından yapıldı ve her anastomoza 7-8 adet sütür kondu. Kontrol grubuna intraperitoneal 1 cc SF uygulandı. Fasya 3/0 katgt ile aralıklı olarak, cilt 3/0 ipekle sütürlerle kapatıldı. İşlem sonrası ratlar, postoperatif 6. saatten itibaren standart laboratuvar yemi ve su ile beslendiler.

3.1 Patlama Basıncı lm

Operasyon sonrası 7. günde ratlar eter anestezisini takiben servikal dislokasyonla sakrifiye edildiler. Karın açıldıktan sonra anastomoz yapılan segment bulundu ve etrafı keskin disseksiyonla serbestleştirildi. Anastomozun bütünlüğünün korunmasına zen gösterildi. Anastomozun proksimali ve distalinden 3'er cm'lik kısımlarındaki kolon segmentlerine cut-down yöntemiyle 6 fench kalınlığında umblikal kateterler (*Umblikal kateteri-Bıçakçılar*)

yerleştirildi. Kateterler kolon üzerinden 2/0 ipekle, etrafından sıvı sızdırmayacak şekilde tespit edildi (Resim 3.3.4).



Resim 3.3.4

Böylece ortasında anastomoz hattı bulunan yaklaşık 6 cm'lik kapalı bir luminal segment elde edilmiş oldu. Anastomozun distal ucuna yerleştirilen kateterden sabit hızla SF verilirken proksimal uca yerleştirilen kateterle monitör (*Biopac MP30 ultimate system Santa Barbara USA*) arasında bir transduser (*SS13L basınç transduseri*) ve basınç kablosuyla (*Morton basınca dayanıklı pressure line code: 441-Türkiye*) bağlantı kurulup intraluminal basınç elektronik olarak monitörize edildi (Resim 3.3.5).



Resim 3.3.5

Anastomozun sıvı kaçırdığı andaki ani basınç azalması öncesi monitörde görülen en yüksek değer *patlama basıncı* olarak kabul edildi (70). Patlama basıncı değerleri *mmHg* olarak belirlendi. Kayıtlar Pentium II 266 tabanlı bir bilgisayara aktarıldı ve Biopac BSL Pro 3.6.7 versiyonu program ile analizi yapıldı.

Patlama basınçları tespit edilen anastomozlu kolon segmentleri uzun eksenleri boyunca (*anastomoza dik olarak*) ikiye ayrıldı. Örneklerden biri histopatolojik inceleme için, diğeri de hidroksprolin düzeyi saptanması için ayrıldı.

3.2 Hidroksprolin Düzeyi Ölçümü

Doku örneklerinin hidroksprolin düzeyleri Adnan Menderes Üniversitesi Biyokimya Laboratuvarı'nda Reddy ve Enwermeke'nin tanımladığı metoda göre kör olarak saptandı. Her bir doku parçasından yaş örnek alındı ve eppendorf tüpler kullanılarak 50 µl 2N NaOH içinde homojenize edildi. Homojenize edilen örnekler 120 C'de 20 dakika otoklavlanarak hidrolize edildi. Elde edilen hidrozilatların üzerine 900 µl kloramin-T eklenerek oksidasyon

için oda ısısında 25 dakika beklendi. Okside edilen örneklerin üzerine 1000 µl Erlich reaktifi eklenerek 65 C de 20 dakika inkubasyon ile renkli bileşik oluşumu sağlandı. Her bir örneğin absorbansı Shimatzu 550 V spektrofotometresi kullanılarak 550 nm dalga boyunda köre karşı okundu. Hidroksiprolin konsantrasyonu standart L-hidroksiprolin solüsyonunun grafiği yardımıyla hesaplandı. Sonuçlar µg/mg yaş doku olarak kaydedildi (79).

3.3 Histopatolojik Çalışma

Doku örneklerinin histopatolojik inclemesi Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Anabilim Dalı Laboratuvarı'nda *kör* yöntemle, tek bir patolog tarafından yapıldı. Tüm bağırsak doku örnekleri %10'luk tamponlanmış formolin solüsyonunda fikse edildi. Anastomoz hattı çevresindeki alanlardan alınan doku örnekleri rutin doku işlemleri sonrasında parafine gömüldü. Parafin bloklardan 4 mikronluk kesitler hazırlandı. Bu kesitler hemotoksilen-eozin ile boyanarak ışık mikroskopunda (*Olympus, BX51, Japan*) incelendi. Histolojik kesitler nötrofil, makrofaj, fibroblast, neovaskülarizasyon ve mukozal oluşum açısından değerlendirildi. Mukozal iyileşmenin derecesi ve inflamasyonun şiddeti semikantitatif yöntem ile skorlandı. Mukozal iyileşmenin derecesi ile inflamasyonun şiddeti toplanarak, her denek için histopatolojik inceleme skoru ayrı ayrı hesaplandı

Skor	Mukozal iyileşme	Nötrofil infiltrasyonu	Makrofaj, fibroblast ve neovaskülarizasyon
0	İyileşme yok	>%75	Yok
1	Yüzey epitelinin iyileşmesi	%25-75	Az
2	Submukozal tabaka iyileşmesi	%25-50	Yoğun
3	Muskularis mukoza iyileşmesi	<%25	*
4	Tam iyileşme	Yok	*

Tablo 3.3.1 Mukozal İyileşme ve Nötrofil İnfiltrasyonu Skorlaması

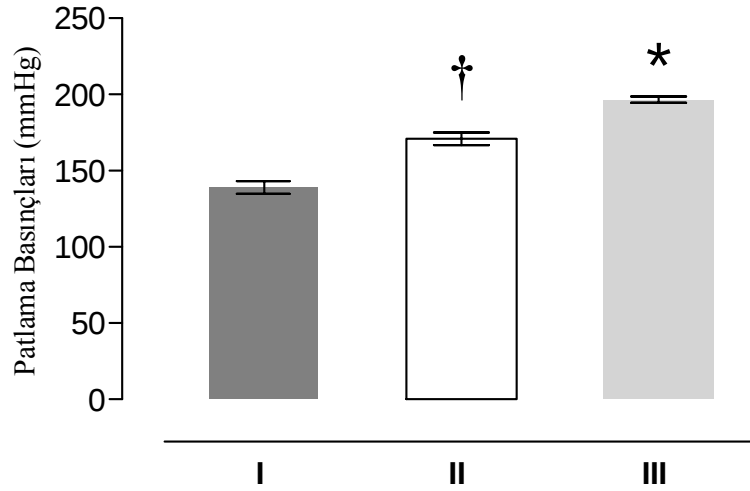
4. BULGULAR

4.1 Anastomoz Patlama Basınçları

Operasyon sonrası 7. gündeki patlama basınçları ve grup ortalama değerleri Tablo 4.1.1’de gösterilmiştir.

Ratlar	Kontrol	Grup II (100 mg/kg)	Grup III (200 mg/kg)
1	145	165	195
2	126	161	205
3	164	169	198
4	156	176	185
5	132	208	202
6	141	164	208
7	143	170	188
8	131	159	194
9	127	172	192
10	126	170	197
Ort. Değ	139.1±4.17	171.4±4.38	196.4±2.28

Tablo 4.1.1. Anastomoz Patlama Basınçları (mmHg)



Şekil 4.1.1 Anastomoz Patlama Basınçları (mmHg)

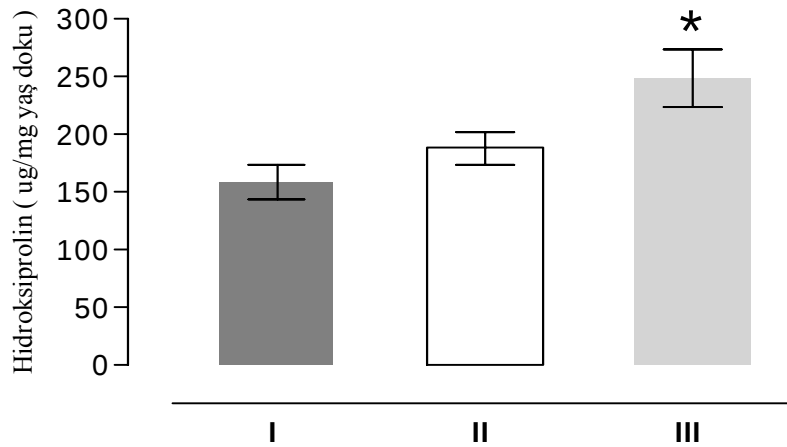
Askorbik asit enjeksiyonu uygulanan her iki grupta da (II[†] ve III^{*}) patlama basıncı değerleri kontrol grubundaki ratlara oranla yüksekti (p<0.05). Ayrıca, Grup III'ün (200 mg/kg askorbik asit) değerlerinin grup II'ye göre daha yüksek olduğu görülmekteydi (p<0.05).

4.2 Doku Hidroksiprolin Düzeyleri

Operasyon sonrası 7. gündeki ortalama hidroksiprolin düzeyleri $\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş doku olarak Tablo 4.2.1'de gösterilmiştir. Grup III'teki* (200 mg/kg) ratların hidroksiprolin düzeyi, hem kontrol grubuna, hem de 100 mg/kg askorbik asit uygulanan Grup II'ye oranla yüksekti (p<0.05). Bununla birlikte, 100 mg/kg askorbik asit enjeksiyonu uygulanan ratlar ile kontrol grubu arasında hidroksiprolin düzeyi yönünden fark yoktu (p>0.05).

Ratlar	Kontrol	Grup II (100 mg/kg)	Grup III (200 mg/kg)
1	217,23	183,54	222,08
2	186,82	186,82	223,39
3	183,54	91,90	207,01
4	227,72	196,13	179,87
5	111,57	219,20	225,36
6	142,64	196,26	243,19
7	121,79	183,80	463,18
8	180,13	132,80	203,86
9	116,02	239,91	260,23
10	91,90	248,30	263,51
Ort. Değ	157.9±14.97	187.9±14.82	249.2±25.11

Tablo 4.2.1. Doku Hidroksiprolin düzeyi ($\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş doku)



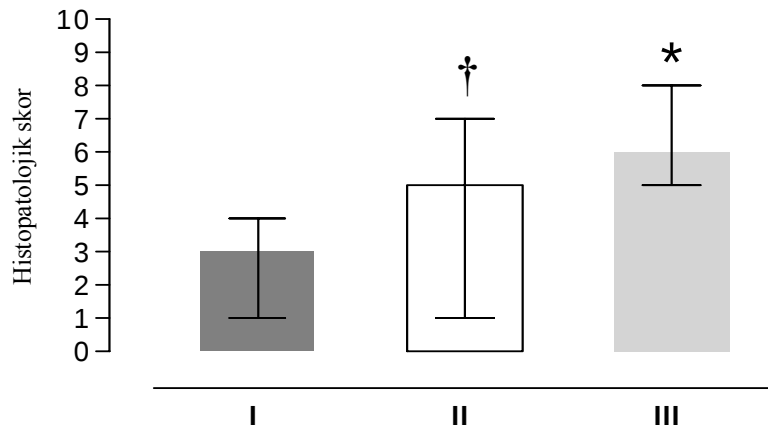
Şekil 4.2.1. Doku Hidroksiprolin Düzeyi ($\mu\text{g}/\text{mg}$ yaş doku)

4.3 Histopatolojik İnceleme Skorları

Operasyon sonrası 7. gündeki histopatolojik inceleme skorları Tablo 4.3.1 de gösterilmiştir. Grupların histolojik skorlamada aldıkları değerler askorbik asit uygulaması ile orantılı olarak artmaktaydı. Askorbik asit verilen her iki grubun (II[†] ve III^{*}) skorları kontrol grubuna göre daha yüksek iken, yüksek doz askorbik asit (200 mg/kg; grup III) uygulamasının grup II'ye göre daha yüksek histolojik skorlarla karşımıza çıktığı görülmekteydi (p<0.05).

Ratlar	Kontrol	Grup II (100 mg/kg)	Grup III (200 mg/kg)
1	3	4	6
2	3	5	5
3	4	5	6
4	2	5	8
5	1	4	7
6	2	5	6
7	2	7	6
8	3	5	5
9	4	3	5
10	3	1	6
Median	3	5	6

Tablo 4.3.1. Histopatolojik inceleme skorları



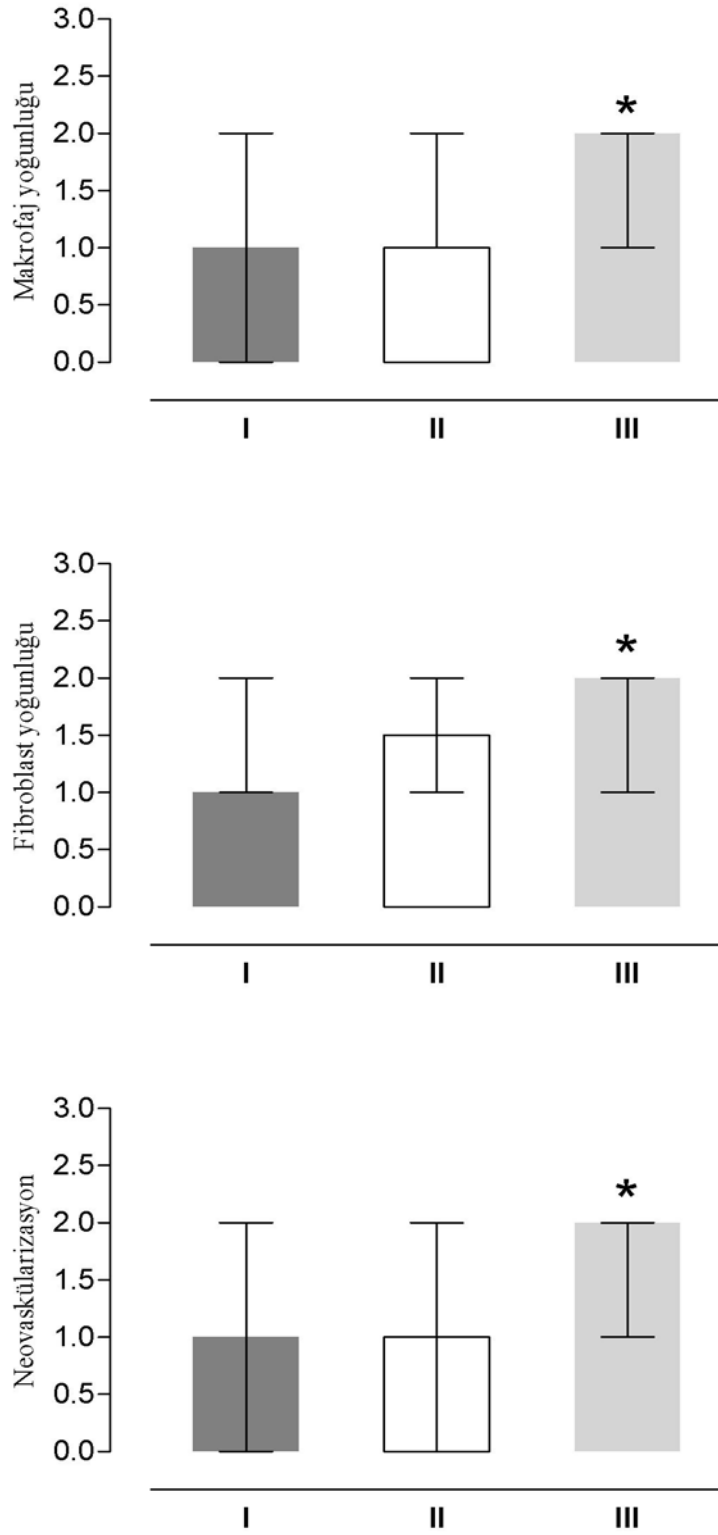
Şekil 4.3.1. Histopatolojik inceleme skorları

4.4 Grupların Ortalama Makrofaj, Fibroblast ve Neovaskülarizasyon Değerleri

Makrofaj ve fibroblast yoğunluğu yüksek doz enjeksiyon yapılan III. Grupta* kontrol grubuna oranla daha yüksekti ($p<0.05$). Ancak; 100 mg/kg askorbik asit enjeksiyonu yapılmasının belirgin bir etkinliği görülmemektedir ($p>0.05$). Neovaskülarizasyon ise III. grupta hem kontrol, hem de 100 mg/kg enjeksiyon grubuna göre yüksekti ($p<0.05$).

	Makrofaj	Fibroblast	Neovaskülarizasyon
Grup I (Kontrol)	1	1	1
GrupII (100mg/kg)	1	1.5	1
GrupIII (200mg/kg)	2	2	2

Tablo 4.4.1 Grupların Ortalama Makrofaj, Fibroblast ve Neovaskülarizasyon Skorları



Şekil 4.4.1 Makrofaj, Fibroblast ve Neovaskularizasyon Skorları

5. TARTIŞMA

Çalışmamızda yüksek doz askorbik asit uygulamasının kolon anastomoz iyileşmesinde belirgin yarar sağladığı görülmüştür. Daha önce de birçok maddenin (ör: A vitamini, çinko, retinol) farklı mekanizmalarla anastomoz iyileşmesinde etkin olduğu gösterilmiştir (64,80,81). Askorbik asidin yara iyileşmesindeki bilinen yararına rağmen, uyguladığımız modelde doza bağımlı ve son derece belirgin bir etkinin ortaya çıkmasının ilginç olduğunu düşünmekteyiz. Askorbik asidin inflamasyon fazındaki etkinliği de bu sürece katkı sağlamış olabilir.

Gastrointestinal anastomozlarda iyileşme inflamasyon -lag fazı- ile başlar (18). Nötrofillerini 3 saat gibi kısa bir süre içinde anastomoz bölgesine göç ettiği hatırlanırsa, dengeli yangı sürecinin önemi ortaya çıkmaktadır (25). Çelişkili olarak, dokuda erken dönemde ortaya çıkan yıkımın temel elementlerinden biri nötrofillerden kaynaklanan matriks metalloproteinazlarıdır (sıklıkla MMP-1, MMP-2 ve 9) (17,27). Yıkım ve onarımın aynı anda sürdüğü bu karmaşık süreçte, sağlıklı inflamasyonun anastomoz iyileşmesindeki etkinliği net olarak bilinmektedir (82).

Doku yıkımı sürecinde sitokinler de rol oynamaktadır. PGE1'in yüksek konsantrasyonlarda, nötrofil kaynaklı doku yıkımını dengeleyecek biçimde proteolitik aktiviteyi engellediği, bu yüzden yüksek konsantrasyonlarda uygulandığında, inflamasyonun erken fazında ortaya çıkabilecek aşırı yıkımı engellediği bildirilmiştir (14). Yine de, nötrofil kaynaklı doku yıkım ürünlerinin olumlu etkileri olduğu da bilinmektedir (17).

Çalışmamızdaki ilginç bulgulardan biri de, inflamasyona yönelik yapılan skorlamanın, artan dozlarda Askorbik asiti uygulaması ile paralellik göstermesidir. Bu sonuca neden olan olası mekanizmalardan biri, PGE1'in askorbik asit tarafından stimüle edilmesi ve yangının erken döneminde beklenen nötrofil kaynaklı yıkımın engellenmesidir. Uyguladığımız skorlama sistemine bakarak değerlendirecek olursak, %25 ve altı nötrofil infiltrasyonun yüksek doz askorbik asit uygulanan gruplarda daha belirgin olduğu görülmektedir.

Düşüncemizi destekleyen bazı bulgular Kronhausen ve ark. (83) tarafından bildirilmiştir. Bu çalışmaya göre, askorbik asit PGE1 üretimini stimüle etmekte ve lenfosit fonksiyonlarına yardımcı olmaktadır (83).

Diğer bulgumuz askorbik asit uygulaması ile patlama basınçlarında görülen artış, dolayısıyla da anastomoz direncine sağlanan katkıdır. Hendriks ve ark. (70) tarafından açıkça gösterildiği gibi, patlama basıncı anastomoz iyileşmesinin en önemli göstergelerinden biridir . Anastomoz hattında erken dönemde ortaya çıkan kollajen konsantrasyon düşüşü sırasında anastomoz dayanıklılığını sütürlerin sağladığı hatırlanacak olursa (45,64,84,85), sütür tekniği ile basınca dayanıklılık arasında direkt bir ilişki olduğu söylenebilir. Ancak; çalışmamızdaki tüm ratlara aynı cerrah tarafından, aynı materyal ile ve aynı sütür tekniği ile anastomoz yapılmış olması, askorbik asit enjeksiyonun bağımsız bir etken olarak karşımıza çıktığını göstermektedir.

Doğal olarak, gerilim kuvvetinin tek belirleyicisi sütür tekniği değildir. Dokuda kollagen birikimi, çoğu zaman ayrılma direncini belirleyen en önemli faktördür (50). Çalışmamızın en dikkat çekici bulgularından biri de, 200 mg/kg (Grup III) askorbik asit uygulanan grubun diğer iki gruba oranla daha yüksek düzeyde hidroksiprolin ile karşımıza çıkmasıdır. Burada şaşırtıcı olan, askorbik asit enjeksiyonu kollagen artımı arasındaki ilişki değildir, çünkü fibriller kollagenlerin direncinin Askorbik asitine bağımlı çapraz bağlardan geldiği daha önce de bildirilmiştir (76). İlginç olan, doza bağımlı etkinin bu denli net olarak ortaya çıkışıdır. En akla yakın açıklama, askorbik asidin, hidroksiprolin molekülün en iyi konfigürasyona ulaşmasını yüksek dozlarda daha fazla etkilemesidir. Askorbik asit, prolinin hidroksilasyonu sürecindeki yüksek etkinliği ile yarayı güçlendirmektedir (77).

Bu noktada akla gelebilecek diğer bir soru da, doku travması sonrasında askorbik asidin daha farklı bir etkisi olup olmadığıdır. Levenson ve ark. (86) tarafından yapılan klinik bir çalışmada travma ve enfeksiyon sonrası hastaların plazma askorbik asit seviyesinin normal

değerlerin altında olduğu gösterilmiştir (86,87). Bunu destekleyen ve Crandon ve ark. (88) tarafından yapılan bir başka çalışmada, parenteral 100 mg/gün askorbik asit uygulamasının bile cerrahi hastalarda etkili olmadığı, ve etkinin 300 mg/gün'de ortaya çıktığını bildirilmiştir. Yukarıda belirtilen çalışmaların da desteklediği gibi, askorbik asit travmaya bağlı doku yanıtında önemli bir rol oynamakta ve doku yaralanmalarında gereksinim artmaktadır (89-91).

Çalışmamızdaki III. grupta görülen, artmış hidroksprolin düzeylerini yüksek doz askorbik asit uygulaması ile ilişkilendirmekteyiz. Bununla birlikte, askorbik asidin yalnızca biokimyasal etkisi ile dokuda iyileşmeyi hızlandırmadığı da düşünülebilir. Bilindiği gibi askorbik asit memelilerdeki en etkili ve en az toksik suda çözünen antioksidan olarak tanımlanmıştır (72,92,93). İskemi-reperfüzyon hasarı sonucunda ortaya çıkan serbest radikalleri etkisiz hale getirerek iyileşme sürecini desteklemektedir (94-97).

Tüm bu sonuçları birlikte değerlendirecek olursak, Grup III'ün iyileşme sürecinde görülen olumlu doku değişikliklerini yüksek doz askorbik asit enjeksiyonuna bağlayabiliriz. Buna ek olarak, Grup III'teki patlama basınçlarının Grup II 'ye göre yüksek oluşu cerrahi stres durumlarında askorbik asit ihtiyacının arttığını ve ihtiyacın karşılanması ile mekanik dayanıklılığın arttığını göstermektedir.

Çalışmamızdaki histopatolojik incelemelerde inflamasyon fazının dominant hücresi olan makrofaj ve proliferasyon fazının dominant hücresi olan fibroblastlar da değerlendirilmiştir. Yüksek doz askorbik asitin bu süreci de etkilediği görülmekle birlikte, Grup III'te görülen neovaskülarizasyon artışı daha dikkat çekicidir. Bilindiği gibi, neovaskülarizasyon proliferasyon fazının önemli bir göstergesidir; proliferasyon fazında intakt venüllerden endotel hücre proliferasyonu sonucu yeni kapiller damarlar yara içine doğru ilerler (17,54). Ancak; 100 mg/kg askorbik asit verilen grupta neovaskülarizasyon kontrol grubundan farksızdır. Daha çok bir spekülasyon olmakla birlikte, yüksek doz askorbik asit uygulamasının neovaskülarizasyon sürecinde devamlılığı sağladığını düşünmekteyiz. Askorbik asit ile

inflamasyon sürecinin dengelenmesi, vaskülarizasyonu uyaran büyüme faktörlerinin dokuda vaskülarizasyonu da uyardığını düşündürebilir.

Sonuç olarak; yüksek doz askorbik asit uygulamasının anastomoz iyileşmesinin belirleyicisi olan tüm parametreleri olumlu etkilediği görülmektedir. Bulgularımızın moleküler düzeyde çalışmalar ile desteklenmesi gerekmektedir. Kolon anastomozu iyileşmesinde suprafizyolojik dozlarda askorbik asit uygulamasının yararlı olduğu anlaşılmaktadır.

6. SONUÇLAR

- 1- Askorbik asit kullanılan Grup II ve III teki patlama basınçlarının Grup I'e göre daha yüksek olduğunu ve de yüksek doz askorbik asit kullanılan Grup III'ün patlama basınçlarının da Grup II'ye göre anlamlı yüksek olduğunu saptadık. $Grup\ III > II > I$
- 2- Askorbik asit kullanılan Grup II ve III teki histopatolojik inceleme skorunun Grup I'e göre daha yüksek olduğunu ve de yüksek doz askorbik asit kullanılan Grup III'ün histopatolojik inceleme skorunun da Grup II'ye göre anlamlı yüksek olduğunu saptadık. $Grup\ III > II > I$
- 3- Çalışmamızdaki yapılan istatistiksel analizde doku kesitlerindeki makrofaj ve fibroblast yoğunluğu kendi aralarında $III>I$, $I=II$, $II=III$ şeklinde korelasyon göstermektedir. Neovaskülarizasyon açısından ise $III> I=II$ şeklinde bir sonuç çıkmıştır. Bu sonuçlarla fibroblast ve makrofaj açısından özellikle yüksek doz askorbik asit kullanılan III. Grupta kontrol grubuna göre anlamlı bir yükseklik bulundu. Neovaskülarizasyon açısından ise Grup III'te I ve II. Gruba göre anlamlı bir artış saptandı.
- 4- Çalışmamızdaki hidroksiprolin düzeyleri açısından gruplar arasında $III >I=II$ şeklinde bir istatistiksel dizilim elde ettik. Bu sonuçla yüksek doz askorbik asit kullanılan III. grubun hem kontrol grubuna hem de düşük doz askorbik asit kullanılan gruplara göre istatistiksel olarak anlamlı yükseklikte hidroksiprolin düzeyleri saptadık. I ve II. gruplarda ise bir fark yoktu.

7. ÖZET

Ratlarda Askorbik Asidin Kolon Anastomozu İyileşmesindeki Etkileri

(Dr. Fehmi CEYLAN)

Kolon anastomozu iyileşmesini etkileyen faktörler üzerinde birçok araştırma yapılmış ve iyileşme sürecini olumlu yönde etkileyebileceği düşünülen ajanlar kullanılmıştır. Kolon anastomozu iyileşmesi değişik etkenlere bağlı olmakla birlikte, yara iyileşmesini ve inflamasyonu doğrudan etkileyen doğal ajanların etkisi tartışmalıdır. Askorbik asit bilinen olumlu etkilerinin yanında, kollagenin yapısını stabilize ederek ve inflamasyon fazını dengeleyerek yara iyileşmesine katkıda bulunmaktadır. Çalışmamızda kolon anastomozu yapılan ratlarda düşük ve yüksek doz askorbik asit kullanımının etkilerini araştırdık.

Bu amaçla, otuz adet ratı eşit olarak 3 gruba ayrıldı: Grup I (kontrol: n=10)'deki ratlara kolon rezeksiyonu ve anastomoz uygulandı, yedi gün süre ile intraperitoneal olarak serum fizyolojik verildi. Grup II (n=10) ve III (n=10)'teki ratlara kolon anastomozunu takiben sırasıyla 100 mg/kg ve 200 mg/kg askorbik asit intramusküler olarak verildi. Yedi günlük tedavinin ardından ratlar sakrifiye edildi. Anastomoz patlama basıncı ve anastomoz hattındaki hidroksiprolin düzeyi ölçüldü. Anastomoz hattı histopatolojik olarak skorlandı.

Çalışmamızda 200 mg/kg askorbik asit uygulaması yapılan ratların tüm parametrelerinde anastomoz direncinin daha yüksek olduğu görülmektedir. 100 mg/kg askorbik asit uygulaması ise kontrol grubuna göre histolojik skor ve patlama basınçlarında avantaj sağlamaktaydı.

Sonuç olarak; yüksek doz olarak nitelediğimiz 200 mg/kg askorbik asit uygulamasının kolon anastomoz iyileşmesini hidroksiprolin düzeyini artırarak ve inflamatuvar yanıtı dengeleyerek hızlandırdığı görüşüne vardık. Anastomoz patlama basınçlarında, III. Grup lehine olan belirgin farklılık da çıkarımlarımızı desteklemekteydi. Yüksek doz askorbik asit uygulaması kolon anastomozu iyileşmesini olumlu yönde etkilemektedir.

8. SUMMARY

The effects of ascorbic acid on colonic anastomotic healing in rats

(Dr. Fehmi CEYLAN)

There exist a variety studies on factors effecting the healing of colonic anastomosis. In addition, the beneficial effect of many agents has been explored. Despite the fact that a number of factors effect the healing of colonic anastomosis, the benefit of natural agents that alter inflammatory process and healing is still a matter of debate. Given to the well-known functions of ascorbic acid, it has been also verified as a stabilizing agent for collagen, and balancing inflammation. In the present study, we have further investigated the effects of high and low dose ascorbic acid on colonic anastomotic healing.

Thirty female Wistar rats were equally divided into three groups: Colonic anastomosis and intraperitoneal saline injection was performed for Group I (control: n=10). At the same time, colonic anastomosis followed by seven days of ascorbic acid injection was done for group II (100 mg/kg), and III (200 mg/kg). In the end of 7 days, the rats were sacrificed. Anastomotic burst pressure was recorded. The anastomosis of the rats were harvested in order to determine the hydroxyproline level and histologic parameters.

Our findings indicated that all parameters concerning anastomotic strength was higher following 200 mg/kg ascorbic acid injection. Besides, 100 mg/kg injection was also found to be beneficial according to the burst pressure and histological score

In conclusion, we postulate that 200 mg/kg injection, which can be regarded as high dose treatment, strongly supports anastomotic healing by increasing hydroxyproline level and inflammatory response. The augmented anastomotic burst pressure in group III is also establishes our conclusion. High dose ascorbic acid administration beneficially effects colonic anastomotic healing

9. KAYNAKLAR

1. Tasdelen A, Algin C, Ates E, Kiper H, Inal M, Sahin F. Effect of leptin on healing of colonic anastomoses in rats. *Hepatogastroenterology*. 2004 Jul-Aug;51(58):994-997.
2. Erbil Y, Calis A, Berber E, Mercan S. The effect of intraoperative colonic lavage with NG-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) on anastomotic healing in the presence of left-sided colonic obstruction in the rat. *Surg Today*. 2000;30(5):421-425
3. Schwab R, Wessendorf S, Gutcke A, Becker P. Early bursting strength of human colon anastomoses--an in vitro study comparing current anastomotic techniques. *Langenbecks Arch Surg*. 2002 Jan;386(7):507-511. Epub 2001 Nov 1
4. Rudinskaite G, Tamelis A, Saladzinskas Z, Pavalkis D. Risk factors for clinical anastomotic leakage following the resection of sigmoid and rectal cancer. *Medicina (Kaunas)*. 2005;41(9):741-746.
5. Rullier E, Laurent C, Garrelon JL, Michel P, Saric J, Parneix M. Risk factors for anastomotic leakage after resection of rectal cancer. *Br J Surg*. 1998;85(3) :355-358.
6. Ikeuchi D, Onodera H, Aung T, Kan S, Kawamoto K, Imamura M, Maetani S. Correlation of tensile strength with bursting pressure in the evaluation of intestinal anastomosis. *Dig Surg*. 1999;16(6):478-485.
7. Matthiessen P, Hallbook O, Rutegard J, Sjodahl R. Population-based study of risk factors for postoperative death after anterior resection of the rectum. *Br J Surg*. 2006;93(4):498-503.
8. Thornton FJ, Barbul A. Healing in the gastrointestinal tract. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):549-573.

9. Karahasanoglu T, Altinli E, Hamzaoglu I, Paksoy M, Yesildere T, Alemdaroglu K. Effect of growth hormone treatment on the healing of left colonic anastomoses in protein-malnourished rats. *Br J Surg*. 1998; 85(7):931-933.
10. Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Collagen metabolism in small intestinal anastomosis . *Am J Surg*. 1987; 54: 288-291
11. Chowcat NL, Savage FJ, Lewin MR, Boulos PB. Direct measurement of collagenase in colonic anastomosis. *Br J Surg*. 1990;77(11):1284-1287.
12. Savage FJ, Lacombe DL, Hembry RM, Boulos PB. Effect of colonic obstruction on the distribution of matrix metalloproteinases during anastomotic healing. *Br J Surg*. 1998;85(1):72-5.
13. Mast BA. Healing in other tissues. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):529-547. Rev
14. Zengin K, Apaydin B, Ünal E, Akı H : Deneysel distal kolon obstrüksiyonlarında preoperatif antegrad serum fizyolojik ve sukralfat lavajlarının primer barsak anastomozu üzerine etkileri. *Kolon ve Rektum Hastalıkları Dergisi*. 1998; 8: 5-10.
15. Beezhold DH, Personius C. Fibronectin fragments stimulate tumor necrosis factor secretion by human monocytes. *J Leukoc Biol*. 1992 Jan;51(1):59-64.
16. Syk I, Agren MS, Adawi D, Jeppsson B. Inhibition of matrix metalloproteinases enhances breaking strength of colonic anastomoses in an experimental model. *Br J Surg*. 2001;88(2):228-234.
17. Henry G, Garner WL. Inflammatory mediators in wound healing. *Surg Clin North Am*. 2003;83(3):483-507.
18. Thompson SK, Chang EY, Jobe BA. Clinical review: Healing in gastrointestinal anastomoses, part I. *Microsurgery*. 2006;26(3):131-136.

19. Ma C, Tarnuzzer RW, Chegini N. Expression of matrix metalloproteinases and tissue inhibitor of matrix metalloproteinases in mesothelial cells and their regulation by transforming growth factor-beta1. *Wound Repair Regen.* 1999;7(6):477-485.
20. Varga J, Yufit T, Brown RR. Inhibition of collagenase and stromelysin gene expression by interferon-gamma in human dermal fibroblasts is mediated in part via induction of tryptophan degradation. *J Clin Invest.* 1995;96(1):475-481
21. Witte MB, Barbul A. General principles of wound healing. *Surg Clin North Am.* 1997 Jun;77(3):509-28.
22. Cronin K, Jackson DS, Dunphy JE. Changing bursting strength and collagen content of the healing colon. *Surg Gynecol Obstet.* 1968;126(4):747-753.
23. Graham MF, Drucker DE, Diegelmann RF, Elson CO. Collagen synthesis by human intestinal smooth muscle cells in culture. *Gastroenterology.* 1987;92 (2):400-405.
24. Martens MF, Huyben CM, Hendriks T. Collagen synthesis in fibroblasts from human colon: regulatory aspects and differences with skin fibroblasts. *Gut.* 1992;33(12):1664-1670.
25. Brasken P, Renvall S, Sandberg M. Fibronectin and collagen gene expression in healing experimental colonic anastomoses. *Br J Surg.* 1991;78(9):1048-1052.
26. Mandai R, Eguchi Y, Tanaka M, Sai Y, Nosaka S. Effects of profound hemodilution on small-intestinal wound healing in rabbits. *J Surg Res.* 2001; 99(1):107-113.
27. Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Breaking strength of small intestinal anastomoses. *Am J Surg.* 1983;145(6):800-803.
28. Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Martens MF, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. *Gut.* 1991;32(12):1482-1487.
29. Jonsson K, Jiborn H, Zederfeldt B. Changes in collagen content of the small intestinal wall after anastomosis. *Am J Surg.* 1985;150(3):315-317.

30. Blikslager AT, Roberts MC. Mechanisms of intestinal mucosal repair. *J Am Vet Med Assoc.* 1997;211(11):1437-1441.
31. Lipkin M, Sherlock P, Bell B. Cell proliferation kinetics in the gastrointestinal tract of man. II. Cell renewal in stomach, ileum, colon and rectum. *Gastroenterology.* 1963;45:721-729.
32. Sturm A, Dignass AU. Modulation of gastrointestinal wound repair and inflammation by phospholipids. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1582(1-3):282-288.
33. Feil W, Klimesch S, Karner P, Wenzl E, Starlinger M, Lacy ER, Schiessel R. Importance of an alkaline microenvironment for rapid restitution of the rabbit duodenal mucosa in vitro. *Gastroenterology.* 1989;97(1):112-22
34. Feil W, Lacy ER, Wong YM, Burger D, Wenzl E, Starlinger M, Schiessel R. Rapid epithelial restitution of human and rabbit colonic mucosa. *Gastroenterology.* 1989;97(3):685-701.
35. Feil W, Wenzl E, Vattay P, Starlinger M, Sogukoglu T, Schiessel R. Repair of rabbit duodenal mucosa after acid injury in vivo and in vitro. *Gastroenterology.* 1987;92(6):1973-1986.
36. Lacy ER. Epithelial restitution in the gastrointestinal tract. *J Clin Gastroenterol.* 1988;10 Suppl 1:S72-77.
37. Moore R, Carlson S, Madara JL. Rapid barrier restitution in an in vitro model of intestinal epithelial injury. *Lab Invest.* 1989;60(2):237-244
38. Nusrat A, Delp C, Madara JL. Intestinal epithelial restitution. Characterization of a cell culture model and mapping of cytoskeletal elements in migrating cells. *J Clin Invest.* 1992;89(5):1501-1511.

39. Graham MF, Diegelmann RF, Elson CO, Lindblad WJ, Gotschalk N, Gay S, Gay R. Collagen content and types in the intestinal strictures of Crohn's disease. *Gastroenterology*. 1988;94(2):257-265.
40. Grotendorst GR, Seppa HE, Kleinman HK, Martin GR. Attachment of smooth muscle cells to collagen and their migration toward platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1981;78(6):3669-3672.
41. Robbins S.L, Cotran R.S, Kumar V. Basic pathology fifth edition,(çev; Özoran Y, Çevikbaş U.)İstanbul 1994 sayfa 56-57
42. Martens MF, Hendriks T. Postoperative changes in collagen synthesis in intestinal anastomoses of the rat: differences between small and large bowel. *Gut*. 1991;32(12):1482-1487.
43. Mast BA. Healing in other tissues. *Surg Clin North Am*. 1997;77(3):529-547.
44. Phillips JD, Kim CS, Fonkalsrud EW, Zeng H, Dindar H. Effects of chronic corticosteroids and vitamin A on the healing of intestinal anastomoses. *Am J Surg*. 1992;163(1):71-77.
45. Koruda MJ, Rolandelli RH. Experimental studies on the healing of colonic anastomoses (review). *J Surg Res*. 1990; 48(5):504-515
46. Aguilar-Nascimento JE, Mathie RT, Man WK, Williamson RC. Enhanced intra-anastomotic healing by operative lavage with nutrient solutients in experimental left sided colonic obstruction, *Br J Surg*. 1995; 82(4): 461-464
47. Robson MC, Steed DL, Franz MG Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories. *Curr Probl Surg*. 2001;38(2):72-140.
48. Tadros T, Wobbes T, Hendriks T. Blood transfusion impairs the healing of experimental intestinal anastomoses. *Ann Surg*. 1992;215(3):276-281
49. Carlson MA. Acute wound failure. *Surg Clin North Am*. 1997 Jun;77(3):607-636.

50. Shandall A, Lowndes R, Young HL. Colonic anastomotic healing and oxygen tension. *Br J Surg.* 1985;72(8):606-609.
51. Schrock T, Cerra F, Hawley PR, et al : Wounds and wound healing (clinical conference). *Dis Colon Rectum*, 1982; 25: 1
52. Hogstrom H, Haglund U, Zederfeldt B. Tension leads to increased neutrophil accumulation and decreased laparotomy wound strength. *Surgery.* 1990 Feb;107(2):215-219.
53. Biert J, Seifert W, de Man B, Wobbles T, Hoogenhout J, Hendriks T. Combined preoperative irradiation and local hyperthermia delays early healing of experimental colonic anastomoses. *Arch Surg.* 1996;131(10): 1037-1042.
54. Dubay DA, Franz MG. Acute wound healing: the biology of acute wound failure. *Surg Clin North Am.* 2003;83(3):463-481.
55. Irvin TT, Goligher JC: Aetiology of disruption of intestinal anastomoses.*Br J Surg*,1973; 60(6):461-464.
56. Schrock TR, Deveney CW, Dunphy JE: Factors contributing to leakage of colonic anastomoses. *Ann Surg*,1973;177(5): 513-518.
57. Stoop MJ, Dirksen R, Hendriks T. Advanced age alone does not suppress anastomotic healing in the intestine. *Surgery.* 1996;119(1):15-19.
58. Mastboom WJ, Hendriks T, de Man BM, de Boer HH. Influence of methylprednisolone on the healing of intestinal anastomoses in rats. *Br J Surg.* 1991;78(1):54-56.
59. Furst MB, Stromberg BV, Blatchford GJ, Christensen MA, Thorson AG. Colonic anastomoses: bursting strength after corticosteroid treatment. *Dis Colon Rectum.* 1994;37(1):12-15.
60. Slim K, Vicaut E, Panis Y, Chipponi J. Meta-analysis of randomized clinical trials of colorectal surgery with or without mechanical bowel preparation. *Br J Surg.* 2004;91(9):1125-1130.

61. Ram E, Sherman Y, Weil R, Vishne T, Kravarusic D, Dreznik ZIs mechanical bowel preparation mandatory for elective colon surgery? A prospective randomized study. Arch Surg. 2005;140(3):285-288.
62. Bucher P, Gervaz P, Soravia C, Mermillod B, Erne M, Morel P. Randomized clinical trial of mechanical bowel preparation versus no preparation before elective left-sided colorectal surgery. Br J Surg. 2005;92(4):409-414.
63. Levenson SM, Gruber CA, Rettura G, Gruber DK, Demetriou AA, Seifter E. Supplemental vitamin A prevents the acute radiation-induced defect in wound healing. Ann Surg. 1984;200(4):494-512
64. Winsey K, Simon RJ, Levenson SM, Seifter E, Demetriou AA. Effect of supplemental vitamin A on colon anastomotic healing in rats given preoperative irradiation. Am J Surg. 1987;153(2):153-156.
65. Zmora O, Mahajna A, Bar-Zakai B, Rosin D, Hershko D, Shabtai M, Krausz MM, Ayalon A. Colon and rectal surgery without mechanical bowel preparation: a randomized prospective trial. Ann Surg. 2003;237(3):363-367.
66. Ballantyne GH. The experimental basis of intestinal suturing. Dis Colon Rectum 1984; 27(1); 61-71
67. Leslie A, Steele RJ. The interrupted serosubmucosal anastomosis - still the gold standard. Colorectal Dis. 2003 Jul;5(4):362-366.
68. Bracken B. Healing of experimental colon anastomoses. Acta Chirurgica Eur J Surg . 1991;supp. 566; 1-51
69. Engin A. Yara iyileşmesi. Engin A. (Ed.), Genel Cerrahi Tanı ve Tedavi İlkeleri, Ankara Atlas Kitapçılık Ltd. Şti, 2000; 132-144
70. Hendriks T, Mastboom WJ. Healing of experimental intestinal anastomoses: parameters for repair. Dis Colon Rectum 1990;33(10): 891-901.

71. Hesp WL, Hendriks T, Schillings PH. Histological features of wound repair: a comparison between experimental ileal and colonic anastomoses. *Br J Surg.* 1985; 66(5):511-518.
72. Sauberlich HE. Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr.* 1994;14:371-391
73. Kayaalp O. Suda çözünen vitaminler. Rasyonel tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, 6. Baskı. Ankara, 1993; Sayfa: 3075-3096.
74. Long CL, Maull KI, Krishnan RS, Laws HL, Geiger JW, Borghesi L, Franks W, Lawson TC, Sauberlich HE. Ascorbic acid dynamics in the seriously ill and injured. *J Surg Res.* 2003;109(2):144-148.
75. Head KA. Ascorbic acid in the prevention and treatment of cancer. *Altern Med Rev.* 1998;3(3):174-186
76. Robbins S.L, Cotran R.S, Kumar V. Basic Pathology seventh. edition,(çev; Özorun Y, Çevikbaş U.)İstanbul 2004 ; Sayfa; 33-61
77. Schwartz S, Shires GT, Spencer FC, Daly JM, Fischer JE, Galloway AC. Principles of Surgery seventh edition, (Çev; Geçim İ. Ethem) Ankara 2004; Sayfa 269-303.
78. S.K. Gaby and V.N. Singh,’’ Vitamine C,’’—Vitamine Intake and Health: A scientific Review, S.K. Gaby, A.Bendich, V Singh and L. Machlin(eds.) Marcel Dekker, N.Y. 1991 p. 103-1043
79. Reddy G.K, Enwemeka C.S. A simplified method for the analysis of hydroxyproline in biological tissues. *Clinic Biochem* 1996; 29(3): 225-229.
80. Waard JW, Wobbes T. Retinol may promote fluorouracil-supressed healing of experimental intestinal anastomoses. *Arch. Surg.*1995; 130(9): 959-965
81. Tumer AR, Kama NA, Tumer L, Reis E, Muftuoglu S. Effects of 5-fluorouracil and zinc on healing of colonic anastomoses in rabbits.*Eur J Surg.* 1999;165(4):369-377.

82. Wasserberg N, Tzakis AG, Santiago SF, Ruiz P, Salgar SK. Anastomotic healing in a small bowel transplantation model in the rat. *World J Surg.* 2004 ; 28(1):69-73. Epub 2003 Nov 26.
83. Eberhard Kronhausen and Phyllis Kronhausen with Harry B. Demopoulos, M.D., *Formula for Life.* William Morrow and Co., New York, 1989, p. 102.
84. Wagner OJ. Influential factors in anastomotic healing. *Swiss Surg.*9(3):105-113
85. JibornH, Ahonen J, Zederfeldt B. Healing of experimental colonic anastomoses III.Collagen metabolism in the colon after left colon resection *Am J Surg.* 1980;139(3):398-405.
86. Levenson SM, Gren RW, Robinson P, Page RC, Johnson RE. Ascorbic acid, riboflavin, thiamin and nicotinic acid in relation to severe injury, hemorrhage and infection in the human. *Ann. Surg.* 124: 840, 1946.
87. Crandon JH, Lennihan R Jr, Mikal S, Reif AE. Ascorbic acid economy in surgical patients. *Ann N Y Acad Sci.* 1961 Apr 21;92:246-67.
88. Crandon JH, Landau B, Mikal S, Balmanno J, JeffersonM, Mahoney N. Ascorbic acid economy in surgical patients as indicated by blood ascorbic acid levels. *N Engl J Med.* 1958 Jan 16;258(3):105-113
89. Coon WW. Ascorbic acid metabolism in postoperative patients. *Surg Gynecol Obstet.* 1962 ;114:522-534.
90. Shukla SP. Plasma and urinary ascorbic acid levels in the postoperative period. *Experientia.* 1969;25(7):704
91. Mason M, Matyk PM, Doolan SA. Urinary ascorbic acid excretion in postoperative patients. *Am J Surg.*1971;122(6):808-811
92. Frei B, England L, Ames BN. Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1989;86(16):6377-6381

93. Tolbert BM. Metabolism and function of ascorbic acid and its metabolites. *Int J Vitam Nutr Res Suppl.* 1985;27:121-138.
94. Kahler W, Kuklinski B, Ruhlmann C, Plotz C. Diabetes mellitus--a free radical-associated disease. Results of adjuvant antioxidant supplementation. *Z Gesamte Inn Med.* 1993 ;48(5):223-32.
95. Wolf, S.P Diabetes mellitus and free radicals. *Br.Med.Bull.* 1993; 49:642,
96. Cowley HC, Bacon PJ, Goode HF, Webster NR, Jones JG, Menon DK. Plasma antioxidant potential in severe sepsis: a comparison of survivors and nonsurvivors. *Crit Care Med.* 1996;24(7):1179-83.
97. Miyagatani Y, Rounds JD, Chambers EA High-dose vitamin C enhances hepatic glutathione levels and increases survival of septic rats *Surg. Forum XLIX* 1998; 55