

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SELENYUM’UN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
UĞRATILMIŞ KAS-DERİ FLEPLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Göktekin TENKECİ
Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Bilge Türk BİLEN

MALATYA – 2011

**T.C.
İNÖNÜ ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ**

**SELENYUM’UN İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA
UĞRATILMIŞ KAS-DERİ FLEPLERİ ÜZERİNDEKİ
ETKİLERİ**

UZMANLIK TEZİ

Dr. Göktekin TENEKECİ
Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı

TEZ DANIŞMANI
Doç. Dr. Bilge Türk BİLEN

MALATYA – 2011

**Bu tez İnönü Üniversitesi Rektörlüğü tarafından 2009/56 proje
numarası ile desteklenmiştir**

TEŞEKKÜR

Bu çalışmanın yapılması sırasında emeği geçen İnönü Üniversitesi Biyokimya A.B.D.'dan Prof. Dr. Yusuf Türköz ve Kamuran Çınar'a, Patoloji uzmanı Dr. Nurhan Şahin'e, İstatistik hesaplamalarını yapan istatistik uzmanı Nazire Bulam'a ve canlı alan oranlarının hesaplamasını yapan İnönü Üniversitesi Makine Mühendisliği Bölümünden Sayın Erkan Bahçe'ye ve bu çalışmanın tez danışmanı İnönü Üniversitesi Plastik Cerrahi A.B.D. Başkanı Sayın Doç. Dr. Bilge Türk Bilen'e teşekkürlerimi sunarım. Çalışmanın patolojik numunelerinin değerlendirilmesi için proje aşamasında Patoloji Bölümünden Prof. Dr. Nasuhi Engin Aydın ile görüşülerek çalışmanın proje başvurusu yapılmış, ancak çalışmalar başlamadan kendisi, bu çalışmanın patolojik inceleme görevini Patoloji Uzmanı Doktor Sayın Nurhan Şahin'e vermesi üzerine bu çalışmanın patolojik incelemeleri Patoloji Uzmanı Sayın Dr. Nurhan Şahin tarafından yapılmıştır.

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR

İÇİNDEKİLER.....	i
TABLolar DİZİNİ.....	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	iv
SİMGELER ve KISALTMALAR.....	vi
1.GİRİŞ VE AMAÇ.....	1
2.GENEL BİLGİLER.....	3
2.1. FLEPLER.....	3
2.1.2. FLEPLERİN SINIFLANDIRILMASI.....	4
2.1.2.1. KAS/KAS-DERİ FLEPLERİNİN VASKÜLER SINIFLANDIRMASI.....	5
2.1.3. REKTUS ABDOMİNİS KAS-DERİ FLEPLERİ.....	6
2.2. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARI.....	9
2.2.1. PRİMER ve SEKONDER İSKEMİ.....	11
2.2.2. REPERFÜZYON ve NO-REFLOW ETKİSİ.....	12
2.2.3. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARININ PATOFİZYOLOJİSİ.....	15
2.2.3.1. SERBEST RADİKALLER.....	19
2.2.3.2. KSANTİN OKSİDAZ SİSTEMİ.....	19
2.2.3.3.NÖTROFİL AKINI.....	20
2.2.3.4. NİTRİK OKSİDİN ROLÜ.....	21
2.2.4. İSKEMİ-REPERFÜZYON HASARINA KARŞI SAVUNMA.....	24
2.2.5. APOPTOZ/NEKROZ.....	27
2.3. BİR ANTOKSİDAN AJAN: SELENYUM.....	28
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
3.1. DENEY PROTOKOLÜ.....	32
3.1.1. OPERATİF TEKNİK.....	32
3.1.2. ÇALIŞMA YÖNTEMİ.....	35
3.1.2.1. HİSTOLOJİK DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ.....	36
3.1.2.2. BİYOKİMYASAL DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ.....	36
3.1.2.3. İSTATİSTİKİ DEĞERLENDİRME YÖNTEMİ.....	37

4. BULGULAR.....	38
4.1. HİSTOLOJİK BULGULAR.....	38
4.2. BİYOKİMYASAL SONUÇLAR.....	42
4.2.1. MDA SONUÇLARI.....	42
4.2.2. NO SONUÇLARI.....	42
4.2.3. GLUTATYON SONUÇLARI.....	43
4.3. CANLI ALAN HESAPLANMASI.....	44
4.4. İSTATİSTİK SONUÇLARI.....	46
4.4.1. MDA DÜZEYLERİ.....	46
4.4.2. NO DÜZEYLERİ.....	47
4.4.3. REDÜKTE GLUTATYON DÜZEYLERİ.....	48
4.4.4. CANLI ALAN ORANI.....	49
5. TARTIŞMA.....	51
6. SONUÇ.....	61
7. ÖZET.....	64
8. SUMMARY.....	66
9. KAYNAKLAR.....	68

TABLÖLAR DİZİNİ

TABLÖ 1: Gruplar arasında nötrofil infiltrasyonunun şiddetinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi.....	38
TABLÖ 2: Gruplar arasında neovaskülarizasyon yoğunluğunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi.....	39
TABLÖ 3: Her iki gruptaki MDA seviyeleri. Değerler nmol/g yaş doku cinsinden belirtilmiştir.....	42
TABLÖ 4: Her iki gruptaki nitrik oksid seviyeleri. Değerler nmol/g yaş doku cinsinden belirtilmiştir.....	43
TABLÖ 5: Her iki gruptaki redükte glutatyon seviyeleri. Değerler nmol/g yaş doku cinsinden belirtilmiştir.....	43
TABLÖ 6: Her iki gruptaki canlı alan oranının yüzdelik cinsinden hesaplanarak elde edilen sonuçları.....	44
TABLÖ 7: Malonildialdehid seviyelerinin istatistiki olarak değerlendirilmesinde Mann Whitney U test kullanılmıştır ve grup1'deki malonildialdehid seviyeleri grup 2'deki seviyelere nazaran istatistiki olarak anlamlı şekilde daha yüksektir.....	46
TABLÖ 8: Nitrik Oksid seviyelerinin istatistiki olarak değerlendirilmesinde t-test istatistiği kullanılmıştır ve grup1 ile grup 2'deki nitrik oksid seviyeleri arasında istatistiki olarak bir fark saptanmamıştır.....	47
TABLÖ 9: Redükte glutatyon seviyelerinin istatistiki olarak değerlendirilmesinde t-test istatistiği kullanılmıştır ve grup1 ile grup 2'deki redükte glutatyon seviyeleri arasında istatistiki olarak bir fark saptanmamıştır.....	48
TABLÖ 10: Canlı alan oranının istatistiki olarak değerlendirilmesinde t-test istatistiği kullanılmıştır ve grup1'deki canlı alan oranı grup 2'deki canlı alan oranından istatistiki olarak belirgin şekilde daha küçüktü.....	49

ŞEKİLLER DİZİNİ

ŞEKİL 1: Oksijen molekülüne elektron eklenmesi sonucu reaktif oksijen radikallerinin oluşumu.....	17
ŞEKİL 2: Hidroksil radikalının oluşum mekanizmaları.....	18
Şekil 2a: Fenton Reaksiyonunun şematik çizimi.....	18
Şekil 2b: Haber- Weiss Reaksiyonunun şematik çizimi.....	18
ŞEKİL 3: İskemi-Reperfüzyon hasarlanmasında süperoksid dismutaz ve katalazın reaksiyonlarının şematize edilmiştir.....	25
Şekil 3a: Süperoksid Dismutazın süperoksid radikallerini hidrojen perokside dönüştürmesi şematize edilmiştir.....	25
Şekil 3b: Katalazın hidrojen peroksidi suya dönüştürmesi şematize edilmiştir.....	25
ŞEKİL 4: Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın hidrojen peroksid redüksiyonundaki fonksiyonları şematize edilmiştir.....	26
ŞEKİL 5: Çalışmamızda kullanılan ratlarda transvers rektus abdominis kas flebinin planlanması.....	33
ŞEKİL 6: Transvers rektus abdominis kas-deri flebinin kaldırılmış hali. Transillüminasyon yöntemi ile flebin pedikülü görülebilmektedir.....	34
ŞEKİL 7: Transvers rektus abdominis flebinin pedikülü iskeletize edilerek klemplenmiştir.....	34
ŞEKİL 8: Grup 1, 1. Gün. Damar duvarında nötrofil adhezyonu ve nötrofil infiltrasyonu. (H&E x 40).....	39
ŞEKİL 9: Grup 1, 1.gün, kas lifleri arasında ve yağ dokusunun içinde şiddetli nötrofil infiltrasyonu.(H&E x 20).....	40
ŞEKİL 10: Grup 2, 1. gün. Kas lifleri arasında hafif nötrofil infiltrasyonu. (H&Ex20).....	40
ŞEKİL 11: Grup 2, 10. gün. Orta derecede neovaskularizasyon. (H&Ex20).....	41
ŞEKİL 12: Grup 1, 10. gün. Hafif neovaskularizasyon.(H&Ex 40).....	41
ŞEKİL 13: 10. günün sonunda grup 1'deki deneklerden elde edilen bir fotoğraf.....	45
ŞEKİL 14: 10. günün sonunda grup 2'deki deneklerden elde edilen bir fotoğraf.....	45

ŞEKİL 15 : Grup 1 ve grup 2'deki deneklerin ortalama malonildialdehid seviyelerinin şematik olarak gösterilmesi.....	47
ŞEKİL 16: Grup 1 ve grup 2'deki deneklerin ortalama nitrik oksid seviyelerinin şematik olarak gösterilmesi.....	48
ŞEKİL 17: Grup 1 ve grup 2'deki deneklerin ortalama redükte glutatyon seviyelerinin şematik olarak gösterilmesi.....	49
ŞEKİL 18: Grup 1 ve grup 2'deki deneklerde elde edilen ortalama canlı alan oranlarının şematik olarak gösterilmesi.....	50

SİMGELER ve KISALTMALAR

ATP	: Adenozin Trifosfat
O₂⁻	: Süperoksid anyonu
OH	: Hidroksil radikali
NO	: Nitrik Oksid
ONOO⁻	: Peroksinitrit
H₂O₂	: Hidrojen peroksid
ROS	: Reaktif Oksijen Radikalleri
NADPH	: Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat
O₂	: Oksijen molekülü
Fe⁺²	: Demir iyonu
Cu⁺	: Bakır iyonu
FADH₂	: Flavın adenine dinucleotide hidrokinon formu
GSH	: Glutasyon
AMP	: Adenozin Monofosfat
Ca⁺⁺	: Kalsiyum İyonları
ICAM-1	: Hücrelerarası adhezyon molekülü-1
NOS	: Nitrik Oksid Sentaz
VCAM-1	: vasküler hücre adhezyon molekülü-1
mRNA	: Mesajcı Ribonükleik Asid
cNOS	: Esas (constitutive) Nitrik Oksid Sentaz
iNOS	: Çözünmeyen (insoluble) Nitrik Oksid Sentaz
Mn	: Manganez
H⁺	: Hidrojen iyonu
H₂O	: Su molekülü
e⁻	: Elektron
GSH	: Redükte glutasyon
GSSG	: Okside glutasyon
DNA	: Deoksiribo Nükleik Asid

GR	: Glutasyon Redüktaz
GPx	: Glutasyon peroksidaz
GPx-1	: Sitozolik
GPx-2	: Epitele özgü gastrointestinal glutasyon peroksidaz
GPx-3	: Hücre dışına salınan plazma glutasyon peroksidaz
GPx-4	: Fosfolipid ve kolesterol hidroperoksidlerini redükte eden glutasyon peroksidaz
GPx-6	: Olfaktor epitel ve embriyonik dokularda bulunan glutasyon peroksidaz
TrxR	: Tiorredoksin redüktaz
SeP	: Selenoprotein P
LDL	: Düşük dansiteli lipoprotein
İ/R	: İskemi - reperfüzyon
Se	: Selenyum
TBA	: Tiyobarbitürik asid
MDA	: Malonildialdehid
TCA	: Triklor asetik asit
DTNB	: Ditiyobis-2-nitrobenzoik asit
ALT	: Alanin Amino Transfera

1.GİRİŞ VE AMAÇ

Ampute uzuvların replantasyonunda, organ nakillerinde ve serbest flep aktarımlarında mikrocerrahi kullanılmaktadır. Ancak mikrocerrahi ve yöntemlerinin kendilerine özgü riskleri bulunmaktadır. Bu riskler arasında başta geleni iskemi-reperfüzyon hasarının gelişimidir. Plastik cerrahide iskemi-reperfüzyon hasarlanmasının olumsuz etkileri replantasyon ve serbest flep cerrahilerinde görülebilmektedir. İskemi-reperfüzyon hasarının gelişimi ile ilgili çeşitli süreçler mevcuttur. Bu süreçler, serbest fleplerin, amputatların ve nakledilen organların vb. total kaybına kadar giden dramatik sonuçlara yol açabilmektedir. Dünyada artmış mikrocerrahi ve serbest flep deneyimine rağmen iskemi-reperfüzyon hasarı gelişimi halen önümüzde önemli bir sorun olmaya devam etmektedir. Bu sebepten, iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesine yönelik önlemler ve/veya etkilerini azaltmaya yönelik çalışmalar devam etmektedir. Bizim çalışmamızda selenyumun iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış rektus abdominis kas-deri flepleri üzerindeki etkisi araştırılmıştır.

Hücressel düzeyde antioksidan sistemde selenyum içeren glutatyon peroksidaz izoenzimlerinin ve çeşitli selenoproteinlerin vücuttaki varlığı, selenyum tedavisinin, iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılan kas-deri flepleri üzerinde olumlu etkiye sahip olabileceği düşünülmüştür. Zapletal ve arkadaşlarının (1) karaciğerde iskemi reperfüzyon

hasarlanmasında selenyum kullanımı, Yousuf S ve arkadaşlarının (2) serebral iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında selenyum kullanımı ve bu çalışmaların sonucunda deneysel ortamda elde edilen başarılı sonuçlar selenyumun iskemi-reperfüzyon hasarlanması üzerine olan etkinliğine örnek olarak gösterilebilir. Klinikte doku defektlerinin rekonstruksiyonunda ve kaybolan hareket fonksiyonunun giderilmesinde sıklıkla kullanılan önemli bir tedavi seçeneği kas-deri flepleridir. Kas-deri fleplerinin ve proksimal ekstremité amputatlarının ana komponentlerinden olan kas dokusunda, cilt flepleriyle karşılaştırıldıklarında nazaran iskemi-reperfüzyon hasarı daha erken dönemde gelişmektedir. Yapmış olduğumuz çalışmada, metabolizması daha hızlı olması nedeniyle, klinikte iskemi-reperfüzyon hasarına fasyokutan fleplerden daha duyarlı olan kas-deri fleplerinden, rektus abdominis flebi, seçilerek kaldırıldı. Oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında selenyumun etkinliğinin değerlendirilmesi amaçlandı. Selenyum ucuz ve kullanımı pratik bir ajan olduğundan, selenyumun antioksidan etkinliğinin kas-deri fleplerinde de kanıtlanması, bu fleplerin serbest aktarımlarında ve replantasyonlarda, oluşacak iskemi reperfüzyon hasarının azaltılabilmesi amacıyla klinik uygulamalarda da kullanılabilecektir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. Flepler

Flep, kendi vasküler dolaşımının devamlılığı korunmadan taşındığı alıcı alandan beslenen yaşamını sürdüremeyecek kadar yüksek metabolik ihtiyaçları olan doku bloklarına verilen isimdir. Bu doku bloklarının kendilerine ait bir dolaşımları mevcuttur. Flepler herhangi bir sebeple oluşmuş doku kaybını gidermek, oluşan bir kaviteyi doldurmak, kaybolan bir fonksiyonu geri kazanmak amaçları güdülerek başka bir bölgeye (alıcı alana) taşındıkları zaman, kendi dolaşımlarının varlığı sebebi ile, taşındıkları alanda (alıcı alanda) canlılıklarını koruyabilmektedirler. Flepler genellikle, travmatik veya konjenital sebeplere bağlı ya da, tümör eksizyonları sonrası oluşan doku ve/veya fonksiyon kayıplarının ve vücut simetrisinin fonksiyonel ve estetik olarak rekonstruksiyonunun yapılabilmesi amacı güdülerek çok geniş endikasyonlarda kullanım alanı bulmaktadır. Rekonstruktif amaca uygun olarak cilt, fasya, kas, yağ, kemik içeren dokular, ihtiyaca göre farklı kombinasyonlarda seçilip kaldırılarak başka alanlara rekonstruksiyon amacı ile taşınabilmektedir.

2.1.2. Fleplerin Sınıflandırılması

Vücudun her bölgesinde oluşabilecek defektlerin rekonstruksiyonu için çeşitli flep seçenekleri mevcuttur. Bu defektler benzer dokuların benzer dokular ile yer değiştirmesi prensibine bağlı olarak rekonstrükte edilmelidir. Ayrıca fleplerin kanlanma şekli de, defektin rekonstruksiyonu için yapılacak planlamada verilecek kararlar yakından ilgili olan önemli bir konudur. Bu sebeple, kullanılabilecek olan çok sayıdaki flep seçeneği arasından seçim yaparken ve yaşanabilecek zorlukları aşmak amacı ile fleplerin sınıflandırılmasına ihtiyaç duyulmuştur. ‘Flepler defekte yakınlıklarına göre (lokal veya distant), flebin hareket şekline göre, vaskularitesine göre doku içeriğine göre veya flebin hareketi öncesinde yapılan uygulamalara göre sınıflandırılabilirler’(3). ‘Hareket şekillerine göre sınıflandırılacak olunursa, ilerletme, transpozisyon, rotasyon, interpolasyon, pediküllü, tüp ve, serbest flepler olarak kategorize edilebilirler’(3). ‘Vasküler anatomi flep canlılığının sağlanabilmesi için önemli bir faktördür’(4). ‘Kanlanmalarına göre flepler direkt veya indirekt olarak sınıflandırılabilirler’(3). ‘Kas ve derin fasiya arasındaki damarsal bağlantılar kutanöz dolaşımın primer kaynağı olmaları, flep sınıflandırılmasında bu damarsal bağlantıların temel olduğunu söyleyebiliriz’(4). ‘Eğer flep, komşuluğundaki bir kasın perforatörlerinden besleniyor ise, muskulokutan veya perforatör flep olarak tanımlanır’(3). ‘Eğer flebi besleyen damar, kaslar arasındaki fasiya veya fibroz septaların arasından geçiyorsa, bu fleplere de fasiyokutan flepler denir’ (3). ‘Bu gibi durumlarda bu fleplerin indirekt kanlanmaya sahip olduğunu söyleyebiliriz’(3)’. ‘Flepler doku içeriklerine göre de sınıflandırılabilirler’(3). ‘Basit flepler sadece cilt içerirken, kompozit flepler cilt, yağ, kas, kemik, fasiya gibi birçok yapıyı içerebilir’(3). ‘İçerdikleri dokulara göre flepler ayrıca kemik (osseoz flep), vissera (bağısak ve ömental flepler), ve cilt (kutanöz flepler) olarak sınıflandırılabilirler’(4). ‘Çeşitli ihtiyaçların giderilmesi amacı ile uygulanan özellikli fleplere örnek olarak hareket sağlanabilmesi için sinir innervasyonlu kas fleplerinin kullanımı, his duyusunun sağlanması için duyu sinirlerinin flebe dahil edilmesi veya distal yapıların ‘flow through’ perfüzyonunu sağlamak için konduit fleplerin kullanımı gösterilebilir’(3)’.

2.1.2.1. Kas/Kas-Deri fleplerinin Vasküler Sınıflandırılması

‘Kas dolaşımı, kas dokusuna kasın orijin ve insersiyosu arasında kasa giren vasküler pedikül veya pediküllere bağlıdır’(4). ‘Mathes ve Nahai kas ve damar pediküllerinin anatomik ilişkileri temel alınarak kaslar için bir sınıflandırma sistemi tanımlamışlardır’(5). ‘Kasa giren pedikülün bölgesel kaynağı, pedikülün sayı ve boyutu, kasın orijin ve insersiyosuna göre pedikülün yerleşimi ve intramusküler damarların anjiyografik paternleri dikkate alınarak bu sınıflandırma sistemi ortaya çıkarılmıştır’(5). ‘Pedikül, kasın bulunduğu spesifik anatomik bölgede bulunan major bir damarın dalı olan bir arter ve ilgili bölgesel vene drene olan bir çift vena komitantes’ten oluşur’(4). ‘Küçük vasküler pediküllerin sayı ve büyüklüğü değişkendir’(4). ‘Kas flebi kadırılması sırasında dominant pedikülün kesilmesi genellikle kasın avasküler nekrozuna yol açarken, minor pediküllerin kesilmesi durumunda ise dolaşım daha büyük olan dominant vasküler pedikül tarafından sağlanır’(4). Mathes ve Nahai’nin tanımlamış oldukları kas/kas-deri flebi sınıflandırması aşağıdaki gibidir.

Tip 1:

‘Tek vasküler pedikül, anatomik olarak tip 1 vasküler paterni temsil eder’ (4,5). ‘Bu kaslara örnek olarak: gastrokinemius, tensör fasiya lata, kolon vb. gibi örnekler verilebilir’(4,5).

Tip 2:

‘Dominant ve minor vasküler pediküller, tip 2 vasküler paternli kasları beslerler’ (4,5). ‘Flep elevasyonu sırasında minor pediküllerin kesilmesi sonrası, dominant pedikülün bu gruptaki kas fleplerinin dolaşımını sağlar’(4,5). ‘İnsan kaslarında en sık rastlanan dolaşım paternidir’(4,5). ‘Tip 2 vasküler paternli kaslara örnek olarak gracilis, rektus femoris, soleus, trapezius kasları gösterilebilir’(4,5).

Tip 3:

‘Tip 3 kaslar iki dominant vasküler pedikül tarafından beslenir’(4,5). ‘Bu pediküller birbirinden ayrı birer bölgesel kaynaktan gelebilir veya vasküler pediküller birbirlerinin karşı tarafından geliyor olabilirler’(4,5). ‘Yapılan çalışmalarda bu iki vasküler pedikülden

birinin kesilmiş olması, nadiren kas flebinin kaybına neden olabileceği gösterilmiştir'(4,5). 'Tip 3 vasküler paternli kaslara örnek olarak rektus abdominis, temporalis, serratus anterior, gluteus maksimus gösterilebilir'(4,5).

Tip 4:

'Tip 4 kas grubuna dahil kaslarda yapılan anatomik çalışmalarda, kas kitlesi boyunca multipıl/segmental vasküler pediküllerin kasa girdiği gösterilmiştir'(4,5). 'Bu pediküllerin iki veya üçünden fazlasının kesilmesi distal kas nekrozuna yol açar'(4,5). 'Tip 4 kas grubunda olan kaslara örnek olarak sartorius, tibialis anterior flepleri gösterilebilir'(4,5).

Tip 5:

'Tek dominant vasküler pedikül ve sekonder segmental vasküler pediküller vasıtası ile beslenir'(4,5). 'Bu gruptaki kas fleplerinin sadece dominant pedikül üzerinden de, sadece sekonder segmental pedikül üzerinden de güvenli bir şekilde kaldırılabilceği bilinmektedir'(4,5). 'Tip 5 kas grubunda mevcut olan kaslara örnek olarak latissimus dorsi, pektoralis major flepleri gösterilebilir'(4,5).

2.1.3. Transvers Rektus Abdominis Kas-Deri Flepleri

'Rektus abdominis kası anterior ve posterior rektus kılıfları ile sarılmış, orijinini pübik krest ve simfisis pübisten almakta, insersiyosunu da beşinci, altıncı ve yedinci kostaların kırkırdaklarına üç yaprak halinde yapmaktadır'(6). 'Bu flep Mathes ve Nahai'nin tanımladıkları kas ve kas-deri fleplerinin sınıflandırmasına göre 'tip 3' grubuna dahildir'(4,5). 'Tip 3 kaslar iki dominant vasküler pedikül tarafından beslenir'(4,5). 'Rektus abdominis kası 7'den 12. interkostal sinire kadar olan torasik interkostal sinirlerden segmental innervasyon alır'(3). 'Bu kasın motor innervasyonu, 7 ile 12. interkostal sinirlerden gelen segmental motor sinirlerin, kasın derin yüzeyine orta-lateral kısmından girmesi ile gerçekleşir'(6) Başka bir kaynakta da benzer şekilde 'motor sinir dallarının kasın alt yüzünden geçerek orta kısmında kası penetre ettiğini, flebin kaldırılması sırasında

lateralde kas stripi bırakılması durumunda kalan kasın muhtemelen denerve olacağını bildirmiştir'(3).

‘İnternal mammayan arter ve venden köken alan süperior epigastrik arter ve ven ile eksternal iliak arter ve venden köken alan inferior epigastrik arter ve ven , rektus abdominis kasının iki dominant pedikülüdür’(6). Moon ve Taylor’un bir çalışmasından alıntı yapan bir kaynakta derin süperior epigastrik arter ile derin inferior epigastrik arter arasında üç çeşit bağlantı olduğu, tip 1’de tek derin süperior epigastrik arter ve tek derin inferior epigastrik arter bulunurken, tip 2’de iki sistem arasında çift dallı bağlantı bulunduğu, tip 3’te ise üç veya daha fazla damarın bulunduğu bildirilmiştir’(3). ‘Bu kasın minor pedikülleri subkostal ve 6 veya 7 adet interkostal arterler ile vena komitantesleridir ve torasik aort ve inferior vena kavadan köken alırlar’(6). Cilt adası umbilikusun hemen üzeri ile pubisin üzeri arasındaki bölgede planlanır(3).

‘Rektus abdominis kas ve kas-deri flepleri klinikteki rekonstruksiyonlarda en sık kullanılan flep modelleri arasında yer alır’ (7). Mathes ve Nahai’nin kitaplarında, 1960 yılında Milloy ve arkadaşlarının yayınladıkları bir çalışmada ‘115 erkek ve kadın kadavra diseksiyonu yapılarak rektus abdominis kası ve epigastrik arterlerin anatomisinin ve rektus abdominis kası içerisinde seyreden süperior epigastrik arterlerin kas içerisindeki seyir ve dallanmalarını rapor ettikleri’ bildirilmiştir (6). Yine aynı kitapta, 1974 yılında Tai ve Hasegawa’nın bir çalışması olarak, ‘meme rekonstruksiyonu için üst batından hazırlanan transvers abdominal flebi beş hastada kullanarak tanımladıkları’ bildirilmiştir(6). ‘Beş hastanın üçünde delay uygulanmışken geri kalan ikisinde delay uygulanmamıştır’(6). ‘Bu çalışmada kullanılan bu flebi besleyen damarların aslında rektus abdominis kasını perfor eden superior epigastrik arter ve venin dalları olduğunu bildirmişlerdir’(6). 1977 yılında Drever(8), superior ve inferior epigastrik damarların perforatörleri tarafından beslendiğini bildirdiği paramedian epigastrik ada flebi tanımlamış, bununla ilgili bir olgu sunmuştur. Pennington ve Pelly 1980 yılında inferior epigastrik damarlar üzerinden kaldırılan rektus abdominis miyokutan flebinin serbest transferini başarı ile gerçekleştirdiklerini rapor etmişlerdir(9). Ayrıca bu raporda, bu flebin planlanmasına yol açan deneysel araştırmalar da anlatılmıştır(9). 1984 yılında Taylor ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir yayında ‘derin inferior epigastrik sistemin anterior abdominal duvarın geniş bir bölümünü

beslediğini ve local ve serbest transfer için farklı doku kombinasyonları ile çeşitlilik sunduğunu' bildirmişlerdir(10). 'Yapmış oldukları bu yayında ekstremit ve baş-boyun bölgesindeki defektlerin rekonstruksiyonu için kas, miyokutan ve miyosubkutan flepler sunmuşlardır'(10). 'Bu fleplerin diseksiyonunun kolay olduğunu, büyük kalibreli damarlar ile beslendiğini, pediküllerinin uzun olduğunu ve güvenilir olduğunu bildirmişlerdir'(10). 1984 yılında yayınlanan ve Boyd ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 'superior ve derin inferior epigastrik arterlerin vasküler sahaları araştırılmış ve anterior abdominal duvarın beslenmesinde derin inferior epigastrik arterin, superior epigastrik arterden daha etkili olduğunu rapor etmişlerdir'(11). 'Derin epigastrik sistemden çıkan segmental dalların yukarıya ve dışa doğru yönelerek lateral abdominal duvara ulaştığını, bu bölgede alt 6 interkostal arterin terminal dalları ile ve derin sirkumfleks iliak arterin asendan dalı ile anastomoz yaptıklarını bildirmişlerdir'(11). 'Benzer şekilde, superior ve derin inferior epigastrik arterlerin rektus abdominis kası içerisinde, umbilikus seviyesinin üzerinde anastomoz yaptıklarını rapor etmişlerdir'(11). 'Ayrıca, anterior rektus kılıfından çok sayıda arterin çıktığını fakat bunların en yoğun oldukları bölgenin paraumbilikal bölge olduğunu bildirmişlerdir'(11). Yine bu çalışmada, 'meme rekonstruksiyonu planlanan bir hastada derin inferior epigastrik arterin önceden bağlanmasının, superior bazlı rektus abdominis muskulokutan flebinin yapılacağı sırada avantaj sağlayacağını ve cilt adasının büyük paraumbilikal perforatörlerinin üzerine denk getirilmesinin bu flebin vaskülaritesini artıracığını bildirmişlerdir'(11). Yukarıdaki örneklerde de görüldüğü gibi epigastrik arterler tarafından beslenen fleplerin kullanımı konusunda giderek daha çok çalışma yapılarak bu konunun daha iyi aydınlanabilmesi için teknik detaylar elde edilmiştir.

Epigastrik arterler üzerinden kaldırılan bu fleplerin kullanımının giderek yaygınlaşması, bu flep konusunda çeşitli deneysel çalışmaların da yapılması sonucunu doğurmuştur. 1993 yılında Zhang ve arkadaşları 'rektus miyokutan flebinin ratlardaki ilk gerçek miyokutan model olduğuna inandıklarını' bildirmişlerdir(12). Yine 1993 yılında Dunn ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada 'oluşturdıkları gruplar arasında superior epigastrik arter bazlı ve çift pediküllü olarak her iki tarafın derin inferior epigastrik arterleri üzerinden kaldırdıkları gruplarda rat rektus abdominis miyokutan fleplerinin cildinde tama yakın yaşam gözlenirken(%97), tek taraflı derin inferior epigastrik bazlı olarak kaldırılan fleplerin

cildinde daha düşük oranda bir canlılık(%77) olduğu gözlenmiştir’(13). Bu sonuç ratlardaki rektus abdominis kas-deri fleplerinde daha güçlü olan damarın süperior epigastrik sistem olduğu sonucuna varılmasını sağlamıştır.

2.2. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

İskemi-reperfüzyon hasarı, kısa bir sürede ve hızla, çeşitli reaktif oksijen radikallerinin oluşumuna, vücudun antioksidan savunmasının yetersiz kalması sonucu, bu radikallerin hücre ve yapısal elemanlarının üzerinde oluşturduğu hasarlanmalardır. ‘Çok çeşitli sebeplere bağlı olarak gelişebilen iskemi ilgili dokunun kanlanması azlaması veya kaybolması durumudur. Kerrigan ve Stotland, iskemi süresinin ilgili dokunun toleransını aşması durumunda inflamasyon başladığını ve nekroz geliştiğini bildirmiştir’ (14).

Cheung ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmadan alıntı yapan Devlin ‘örneğin, miyokard infarktüsü sırasında ana bir koroner arterin tıkanmasının iskemiye veya azalmış oksijen arzına sebep olduğunu’ bildirdi(15). ‘Hemen ardından mitokondrial elektron transport ve oksidatif fosforilasyon inhibe olarak, intrasellüler ATP ve keratin fosfat seviyeleri azalmaktadır’(15). ‘Hücrel ATP seviyeleri azalırken, anaerobik glikoliz aktive olmakta ve normal hücrel fonksiyonlar sağlanmağa çalışılmaktadır’(15). ‘İskemik dokuda anaerobik metabolizma aktive olduğunda, oksijen, glukoz ve ATP seviyelerinde hızlı bir düşüş ve karbondioksit ve laktik asit seviyelerinde artış görülmektedir’(5). Anaerobik metabolizma aktive olduğundan asidik metabolik ürünler hücre içinde birikmekte, intrasellüler pH seviyeleri düşmekte ve hücre içi ortam daha asidik bir hale dönüşmektedir.

‘İskemi sırasında hücre içerisinde olan biyokimyasal değişiklikler, hücrel disfonksiyona, hücrel ve interstisiyel ödeme ve hücrenin ölümüne sebep olurlar’(16). ‘İskemik dokunun reperfüzyonu hücrel ve interstisiyel ödemi artırır ve mikrodolaşımsal tıkanmaya bağlı olarak kan akımını giderek azaltabilir’(16). Im ve arkadaşları ‘ratlardaki küçük (3x6cm) cilt ada fleplerinde iskemi ve reperfüzyon sonrası oluşan doku hasarlanmasında oksijen kaynaklı serbest radikallerin önemli mediatörler olduğunu önceden gösterdiklerini’ bildirdiler(17). Manson ve arkadaşları ‘çeşitli çalışmalarca, oksijen serbest radikallerinin iskemik doku hasarlanmasının patogeneğinde rolü olduğu bilgisinin desteklendiğini

‘bildirmişlerdir(18). Yine Manson ve arkadaşları ‘uzamış iskemi ardından reperfüzyon yapılmış deneysel ada cilt fleplerinde oksijen kaynaklı serbest radikallerin doku hasarlanmasındaki önemli araçlar olduklarını önceden gösterdiklerini’ bildirmişlerdir(19). Cheung ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmadan alıntı yapan Devlin ‘iskeminin direkt etkilerinin yanısıra, oksijenin bu dokulara yeniden arzı gerçekleşince (reperfüzyon) ve süperoksid (O_2^-), hidrojen peroksit, ve hidroksil radikali (OH) gibi oksijen radikalleri oluşunca etkilenen dokuların uğramış olduğu hasar daha da arttığını’ bildirmiştir(15). ‘İskemik kalplerde akut reperfüzyon sırasında nitrik oksid (NO) ve süperoksitten oluşan peroksinitritin ($ONOO^-$) de içinde bulunduğu çeşitli oksijen radikallerinin olduğu gözlemlenmiştir’ (15). ‘İskemik kalplerin reperfüzyonu lökosit aktivasyonuna sebep olmakta, bunlar da inflamatuvar sürecin mediatörü olarak görev yaparak daha fazla doku hasarının oluşmasına yol açmaktadır’ (15). ‘Cerrahinin tüm dalları için iskemi ortak bir sorundur’(16). ‘Flep kaybına, hasta morbiditesine ve artmış sağlık harcamalarına sebep olmaktadır’(20).

‘İskemi-reperfüzyon hasarı replantasyon ve transplantasyon cerrahisinde karşılaşılan önemli problemlerden birisidir’(21). ‘İskemi-reperfüzyon hasarı transplantasyon yapılan hastalardaki başarı oranını azaltabilmektedir’(22-24). ‘Serbest flep transferi aynı vücudun, bir noktasından başka bir noktasına yapılan transplantasyon olduğundan otolog formda bir transplantasyon olarak değerlendirilir’(14). ‘Bu sebepten, bu hastalara diğer transplantasyonlardan farklı olarak immunsupresyon amaçlanmaz’(14). Bu fark, otolog formdaki bir serbest flep ile transplantasyonlar arasındaki başarı oranını da etkileyen önemli bir faktördür., ‘Serbest flep transferlerinin akut/kronik rejeksiyon gibi immunolojik hadiseler ile ilgisi olmadığından serbest flebin yaşamını tehdit edebilecek tek unsur iskemi-reperfüzyon hasarına yol açan sebepler sonucunda oluşabilecek iskemi-reperfüzyon hasarıdır’(14). ‘Bu sebepten serbest flep nakilleri, iskemi-reperfüzyon hasarının etkilerini çalışmak için ideal modeldirler’(14). Siemionow ve arkadaşları ‘serbest doku nakillerinde gösterilen başarı oranının %90’ın üzerinde olduğunu’ bildirmiştir(25). Yoshida ve arkadaşları da ‘mikrocerrahi ile yapılan vasküler anastomozlarda deneyimli cerrahların başarı oranlarının %90-95 civarında olduğunu’ bildirdi(26). Yapılan bu ve bunun gibi çalışmalar, serbest doku nakillerindeki %5-10 düzeyinde seyreden kayıpların

oranının daha da azaltılması için, gerek patofizyolojik yolların daha iyi anlaşılması, gerekse flep kayıplarının önlenmesi için çeşitli ajanların kullanılmasını amaçlamaktadır.

2.2.1. Primer ve Sekonder İskemi

‘Serbest flep cerrahisinde iskemi ve reperfüzyon, her zaman serbest flebin bir bölgeden başka bir bölgeye transplantasyonu sırasında oluşur, cerrahi prosedürün bir aşamasıdır ve engellenemez’(14). ‘Primer iskemi besleyen vasküler pedikülün klemplenmesi ile başlar ve reperfüzyonun sağlanması ile sona erer. İskemi ve reperfüzyonun akabinde oluşan herhangi bir dolaşım bozucu olay sekonder iskemi olarak bilinir’(14). Primer iskemi süresinin mümkün olduğunca kısa tutulması, sekonder iskeminin de oluşmasının engellenmesi flebin canlılığının korunması için önemlidir. Damar anastomozları sonrası flebin sık sık takip edilerek, arteriyel ve/veya venöz kaynaklı sekonder iskemi gelişmesi halinde, sekonder iskemi gelişimi erken dönemde fark edilerek yapılacak girişimler ile sekonder iskemi süresinin mümkün olduğunca kısa tutulabilmesi çok önemlidir. ‘Sekonder iskeminin nedeni, genellikle zayıf cerrahi tekniktir ve cerrahın mikrocerrahi becerilerini geliştirmesi ile önlenabilir’ (14). Bunun yanı sıra, flep canlılığının korunabilmesi için çeşitli yöntemler denemiştir. Bu yöntemler arasında flebe hipotermi uygulanması da hatırlanmalıdır. Francel ve arkadaşları ‘grade 3 açık tibia-fibula kırıklarının serbest kas flepleri ile kapatılmasındaki başarı oranının yaklaşık %90 olduğunu, lokal olarak hipotermi uygulanması sonucunda kas metabolizması ile no-reflow fenomeninin azaltıldığını ve böylece yapılan son 80 kas transferinde yakalanan başarı oranının %100 olduğunu’ bildirmişlerdir(27). Bu çalışma hipotermi uygulanmasının serbest flep cerrahisinde kas metabolizması ve no-reflow fenomenini azalttığını bildirmiştir(27). Siemionow ve arkadaşları ‘serbest flep cerrahisinde karşılaşılabilecek iskemi sebeplerini üç başlık altında toplamıştır: flebin çok büyük boyutlarda kaldırılması, postoperatif arteriyel tromboz ve postoperatif venöz tromboz’ (25). ‘Kanlanan bölgesi ile karşılaştırıldığında olması gerekenden çok daha büyük kaldırılmış olan fleplerin distal zonlarında distal iskemi oluşmakta ve bunun sonucunda kısmi flep kaybı oluşmaktadır’(25). ‘Arteriyel veya venöz pedikülün ekstra veya intralüminal tıkanmasına

bağlı olarak global iskemi gelişebilmektedir'(25). Yoshida ve arkadaşlarının bildirdiğine göre 'tıkanmalar genellikle teknik bazı hatalar veya vasküler tromboz nedeni ile oluşmakta ve bu durumlarda trombektomi, anastomoz tekrarlanması sonrası kan akımının yeniden sağlanması gerekmektedir'(26). Tıkanma olması halinde trombektomi ve reanastomoz (salvaj) yapılmazsa transfer edilen flebin parsiyel veya total kaybı ile karşılaşilmektedir. 'En sık nedeni de zayıf cerrahi tekniğe bağlı olarak tromboz gelişimi olsa da Kerrigan ve Stotland'ın bir makalesinden alıntı yapan Heuvel ve arkadaşları 'damarın kink olması, hematoma oluşumu, yaranın aşırı sıkı kapatılması veya dren tarafından oluşturulan basıların da anastomotik yetersizliğin diğer sebepleri arasında sayılabileceğini' bildirdi (14). Nahabedian ve arkadaşlarına göre, 'anastomotik başarısızlığın riskini arttıran klinik faktörler arasında önceden yapılan lenf nodu diseksiyonu, önceden alınan radyoterapi kürleri, tütün kullanımı, diabetes mellitus, hastanın yaşı, postoperatif hematoma oluşumu alıcı damar ve rekonstrüksiyon zamanlamasının yanlış yapılması gibi faktörler sayılabilir'(28). Anastomoz yetersizliğinin sebeplerinin bu kadar çeşitli olması operasyon öncesinde, sırasında ve sonrasında ne kadar dikkatli titiz ve yakından takip gerekliliğini ortaya koymaktadır.

Spear'ın kitabından alıntı yapan Heuvel ve arkadaşları 'flep iskemisi ile ilgili şüphelerin, arteriyel veya venöz dopler sinyallerinde veya flebin cilt renginde değişiklik olduğu zaman ortaya çıktığını' bildirmiştir(14). 'Kas dokusunun daha aktif bir metabolizması olduğundan primer iskemiden en çok etkilenen doku tipidir'(25). Bu değişiklikler klinik pratikte flep perfüzyonunu değerlendirmek amacı ile kullanılan yöntemler arasındadır. Yukarıda belirtilen yöntemlere dayanarak flep perfüzyonundaki değişiklikler ne kadar erken dönemde saptanırsa, flebin canlılığını korumağa yönelik girişimler de o kadar erken dönemde yapılabilmekte ve flebin canlılığı o kadar daha korunabilmektedir.

2.2.2. Reperfüzyon ve No-Reflow Etkisi

'İskemi kanın durumunu modifiye ederek veya kan damarlarını zedeleyerek kanın iskemik bölgeye geri dönüşünü bozabilir'(29). 'Bunun sonucunda parenkimde geri

dönüşümsüz hasarlar oluşabilir’(29). Kowada ve arkadaşlarının yapmış olduğu ve Ames ve arkadaşlarının naklettiği bir çalışmada ‘tavşan beyninin beş dakikayı aşan süreler boyunca iskelemlere maruz bırakılıp, arkasından reperfüzyona izin verildiğinde beynin lokalize bazı bölgelerinin perfüze olmadığını’ bildirmişlerdir(29). Ames ve arkadaşları ‘no reflow fenomeninin postiskemik hasarlanmanın patogeneğinde genel bir önemi olduğu sonucuna varmışlardır’(29). ‘No-reflow fenomeninin gelişimi üç ana patofizyolojik süreç ile ilişkilendirilmektedir: hücre içi kalsiyum miktarının artışı, serbest oksijen radikallerine bağlı hasarlanma, ve bozulmuş araşidonik asid metabolizması’(30). Allen ve arkadaşları ‘bu süreçlerce geri dönüşümsüz olarak ilk etkilenen dokunun endotel olduğuna inanıldığını ve parenkimal hücrelerin disfonksiyonuna sebep olduğunu’ bildirmiştir(30). Ashoori ve arkadaşları ‘venöz mikrodamarların lökositler tarafından tıkanmasının iskemik dokulardaki geçici hipoksinin ana sebebi olduğunu, ve anjiogenezin flebin sadece yaşayan kısımlarında oluştuğunu’ bildirdi(31). ‘Granülositler doğal olarak damar endoteline yapışan büyük, sert, viskoelastik hücrelerdir’(32). ‘Kapiller ağlardan geçerken belirgin bir hemodinamik bir direnç oluştururlar ve kapillerler içerisinde eritrositlerden daha yavaş hareket ederler’(32). ‘Kapiller perfüzyon basıncının azaldığı ve/veya arttığı durumlarda inflamatuvar ürünlerin miktarı artmakta ve granülositler endotele daha çok yapışmakta, kapiller endotel ile daha çok temas alanı oluşturmakta ve sonuç olarak lümeni tıkayarak doku hasarını başlatmaktadır’(32). ‘Perfüzyon basıncının normale dönmesinin ardından, granülositler, endotele yapışmış olduklarından dolayı kapillerlerden ayrılamazlar’(32). ‘No-reflow fenomeninin altında yatan sebebi kapiller damarlarda granülositlerin birikerek tıkamanya neden olmasıdır’(32). Okada ve arkadaşlarının bildirdiğine göre granülositlerin yanı sıra, ‘fokal serebral iskelemlere ve reperfüzyonda zamana bağımlı olarak mikrovasküler fibrin birikiminin mikrovasküler tıkanmalara sebep olduğunu’ rapor ettiler(33). ‘Nötrofiller intravasküler kompartmandan, ekstrasvasküler dokuya geçerek oksidan ve hidrolitik enzimlerini salmakta ve parenkimal hücre hasarına sebep olmaktadır’(34). ‘Göç eden bu lökositler, mikrovasküler bariyeri bozarak mikrovasküler geçirgenliği artırmak suretiyle, transkapiller sıvı filtrasyonuna sebep olup interstisiyel doku basıncını artırmaktadırlar’(34). ‘Böylece kapillerler fiziksel olarak basıya uğrarlar ve mikrovasküler perfüzyonun bozulması sonucu no-reflow fenomeninin gelişimine yol açılmış olur’(34).

Suval ve arkadaşlarının iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış iskelet kaslarında yaptıkları bir çalışmada elde ettikleri sonuçlara göre 'iskemi uygulanmasından 30 dakika sonra mikrovasküler geçirgenlikte belirgin artış gözlemlendiğini ve geçirgenlikteki değişiklik ve iskemi süresi arasında direkt bir bağlantı olduğunu' bildirmişlerdir(35). May ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 'tavşanlardaki iskemik ve denerve serbest epigastrik fleplerde vasküler anastomoz ile kan akımının yeniden sağlanması sonrası no-reflow fenomeni değerlendirilmiştir'(36). 'Bu çalışma sonucunda periferik kan akımına karşı oluşan tıkanmanın progresif olduğunu ve 12 saatlik iskemi sonrasında obstruksiyonun, fleplerin ölümüne sebep olarak, geri dönüşümsüz hale geldiğini' bildirmişlerdir(36). Suval ve arkadaşlarının elde etmiş oldukları bulgular ile Zdelbick ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada elde ettikleri bulgular uyushmaktadır. Zdelbick ve arkadaşları, ratların replante edilen uzuvlarında iskemi sonrasında revaskularizasyon başarısını araştıran bir çalışma yapmışlardır(37). Bu çalışmada 'iki veya üç saatlik iskemi süresi ardından no-reflow fenomenine bağlı olarak uzuvların başarısız replantasyon oranı %0 iken, iskemi başlangıcından dört saat sonra %50, beş saat sonra ise %80 olduğu' bildirilmiştir(37). 'No-reflow fenomeninden sorumlu faktörler arasında, devam eden arteriyel obstruksiyon, arteriyovenöz şantlaşma ve bozulmuş trombojenik-fibrinolitik sistemin varlığı olduğu' bildirilmiştir(37).

'Reperfüzyon sırasında oluşan ROS, endotel hücrelerinde şişme, vazokonstriksiyon ve artmış kapiller geçirgenlik gibi değişikliklere yol açarak mikrodolaşımı bozduğu bilinmektedir' (14). Feng ve arkadaşları, 'no-reflow durumunun aslında vazokonstriktör tromboksanın, vazodilatör etkili prostaglandin E2 ve prostasikline nazaran aşırı salınımı sonucu, global mikrodolaşımsal vazokonstriksiyona yol açılarak oluştuğunu iddia ettiler'(38). Yukarıda anlatılan mekanizmalardan anlaşılabilirceği gibi lökositlerin ve fibrin birikiminin kapiller damarların lümenlerini tıkaması, endotel hücrelerinde şişme, damarlar üzerindeki vazokonstriktör/vazodilatör dengesinin vazokonstriktörler lehine değişmesi ve mikrovasküler geçirgenliğin artması sonucu damar dışına sızan sıvıların kapillerlere dışarıdan bası yapması no-reflow fenomenine yol açabilmektedir. No-reflow fenomeni, reperfüzyon sonrasında saatler içerisinde tedricen artan bir seyir izlemektedir.

2.2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarının Patofizyolojisi

İskemi-reperfüzyon hasarı bu hasara uğramış dokuların canlılığını tehdit eden bir hadisedir. ‘İskemik dokuların kurtarılması için kan akımının yeniden sağlanması şarttır ancak reperfüzyon, iskemik dokuların daha da hasarlanmasına neden olan ve iskemi-reperfüzyon hasarlanması olarak isimlendirilen bir sürece yol açabilir’(39). Manson ve arkadaşları ‘çeşitli çalışmalarca, oksijen serbest radikallerinin iskemik doku hasarlanmasının patogenezinde rolü olduğu bilgisinin desteklendiğini ‘bildirmişlerdir(18). ‘Reaktif oksijen radikalleri iki farklı sürecin türevidirler: endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz sistemi ve, nötrofillerdeki Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat (NADPH) oksidaz sistemi’(14).

Hjortdal ve arkadaşları yapmış oldukları çalışmada ‘cilt fleplerinde venöz iskemiye araştırmışlar ve venöz iskemiye, mikrodolaşımsal tromboz ve pıhtılaşma faktörlerinin tükenmesinin eşlik ettiğini’ bildirmişlerdir(40). Yine Hjortdal ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir başka çalışmada ‘cilt fleplerindeki arteriyel iskeminin mekanizmaları araştırılmış ve mikrodolaşımsal intravasküler trombozun varlığı saptanmıştır’(41). Gürlek ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada oluşturmuş oldukları bir iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde kan akımı ve mikrodolaşımsal değişiklikler araştırılmıştır. ‘4 ve 6 saat boyunca iskemiye maruz bırakılmış gruplarda kan akımı ve flebin mikrodolaşımının hiperemik bir yanıt vererek, preiskemik seviyelere göre belirgin olarak arttığını, 16 saat iskemi uygulanan grupta ise kan akımı ve mikrodolaşım değerlerinin, preiskemik seviyelere göre belirgin olarak azaldığını, bunun da iskemi-reperfüzyon hasarına işaret ettiğini’ bildirmişlerdir(42). Bu süreler dokunun iskemiye toleransını göstermekte ve muhtemelen no-reflow fenomenine bağlı olarak iskemi-reperfüzyon hasarını işaret etmektedir. Yine Gürlek ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ‘venöz iskeminin global iskemiden daha zarar verici olduğunu’ bildirmişlerdir (43). Ancak Roberts ve arkadaşlarının yaptığı ve ‘rat ventral ada fleplerinde, arteriyel kanlanma ile venöz drenajı araştırdıkları bir çalışmada, rat ventral ada fleplerinin arteriyel kanlanmadaki azalmaya venöz drenajdaki azalmadan daha duyarlı olduğunu’ bildirmişlerdir(44). Venöz

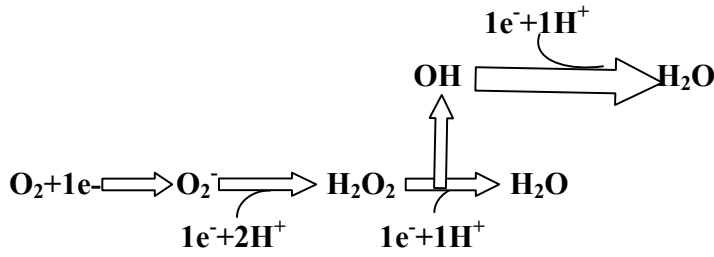
iskeminin mi yoksa arteriyel iskeminin mi flep canlılığı için daha zararlı olduğu konusu tartışmalı bir konu olmağa devam etmektedir.

‘İskeminin hemen ardından, mitokondriyal elektron transport zinciri ve oksidatif fosforilasyon inhibe olarak intrasellüler ATP ve keratin fosfat seviyelerinin azalmasına sebep olmaktadır’(15). İskemik dokuda anaerobik metabolizma aktive olmakta, oksijen, glukoz ve ATP seviyelerinde hızlı bir düşüş, karbondioksit ve laktik asit seviyelerinde artış saptanmaktadır’(5). ‘Hücrel ATP seviyeleri azalırken, anaerobik glikolizin aktive olması normal hücrel fonksiyonlar sağlanması içindir’(15). Anaerobik glikolizin aktive olması sonucunda intrasellüler pH düzeyleri düşeceğinden hücre içi ortam daha asidik bir hal alacaktır. ‘İskeminin direkt etkilerinin yanısıra, oksijenin bu dokulara yeniden arzı gerçekleşince (reperfüzyon) ve süperoksit (O_2^-), hidrojen peroksit, ve hidroksil radikali (OH) gibi oksijen radikalleri oluşunca etkilenen dokuların uğramış olduğu hasar daha da artar’(15). ‘Reaktif oksijen radikalleri iki farklı sürecin türevidirler: endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz sistemi ve, nötrofillerdeki Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat (NADPH) oksidaz sistemi’(14). Bu sistemlerin ürünlerine karşı vücudun bir antioksidan savunma sistemi mevcuttur. ‘İskemi-reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunun, total antioksidan aktiviteye oranı artmaktadır ve bu olay oksidatif stresi işaret etmektedir’(45). ‘Serbest radikaller direkt sitotoksik olmalarının yanısıra, kalsiyum ile birlikte, platelet aktive edici faktör ve lökotrien B4 gibi çeşitli proinflamatuvar lipid mediatörlerinin yanısıra kompleman C5a, tümör nekrosis faktör alfa ve interlökin 1 beta gibi peptid mediatörlerinin sentezini tetikler’(46). Sürecin bu şekilde gelişmesi sonucunda inflamatuvar hücreler bölgeye daha fazla akın etmekte ve iskemi-reperfüzyon hasarına uğramış bölge giderek daha inflamatuvar bir hal almaktadır.

Oksijen radikalleri sadece iskemi-reperfüzyon hasarlanması süreçlerinde oluşmaz. ‘Oksijen radikalleri akut bakteriyel infeksiyonlarda, uzamış enfeksiyonlarda, kozmik radyasyon ve kimyasallara maruziyet gibi durum ve süreçlerde de oluşturulabilir’(15). ROS’nin endotel hücreleri üzerinde olan etkileri iskemi-reperfüzyon hasarlanması sürecinde çok önemli sonuçlar doğurur. ‘Reperfüzyon sırasında oluşan ROS, endotel hücrelerinde şişme, vazokonstriksiyon ve artmış kapiller geçirgenlik gibi değişikliklere yol açarak mikrodolaşımı bozar’ (14). Ashoori ve arkadaşları ‘venöz mikrodamarların

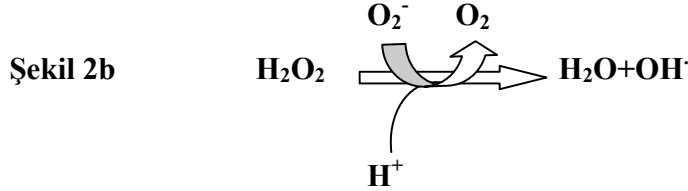
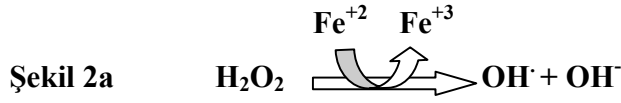
lökositler tarafından tıkanmasının iskemik dokulardaki geçici hipoksinin ana sebebi olduğunu' bildirdi(31).

Mitokondri serbest oksijen radikallerinin birçoğunun oluştuğu organel olduğundan iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında önemli bir yeri vardır. 'O₂'nin elektronik yapısı nedeniyle, her seferinde yapısına bir elektron eklenmesi sonucu hücresel hasara neden olan oksijen radikallerinin oluşumunu kolaylaştırmaktadır' (15). 'Mitokondrilerde yerleşik elektron transport zincirindeki kompleks 1 ve 2 tarafından ubikünon redükte edilerek stabil semikünonu oluşturmakta, ardından stabil semikünondan bir elektronun O₂'e transferi sonucu süperoksit oluşmaktadır'(15). 'Elektronların O₂'ye adım adım transferi sonucu süperoksit anyonu (O₂⁻), hidrojen peroksit(H₂O₂) ve hidroksil radikalleri (OH) mitokondride oluşturulmaktadır'(15). (Şekil 1)



Şekil 1: Oksijen molekülüne elektron eklenmesi sonucu reaktif oksijen radikallerinin oluşumu ve yıkılarak su oluşumunun şematik gösterimi. (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.)

Yukarıda da sayıldığı gibi çeşitli oksijen radikalleri oluşturularak hücrelerdeki hemen hemen tüm yapılara bu radikallerin hasar verdiği bilinmektedir. 'O₂'nin su oluşturmak üzere redükte olması sürecinde, lipid peroksidasyonu ve diğer toksik radikallerin oluşturulması gibi reaksiyonların gelişiminde, hidroksil radikali şüphesiz en tehlikeli oksijen radikalidir'(15). 'Hidrojen peroksit ise tek başına bir serbest radikal olmayıp, Fe⁺² veya Cu⁺'nın varlığında Fenton veya Haber-Weiss reaksiyonu ile hidroksil radikaline dönüştürülmektedir' (15). (Şekil 2)



Şekil 2: Hidroksil radikalının oluşum mekanizmaları (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.).

Şekil 2a: Fenton Reaksiyonunun şematik çizimi (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.).

Şekil 2b: Haber- Weiss Reaksiyonunun şematik çizimi (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.).

Toksik oksijen radikalleri peroksizomlarda da üretilebilmektedir; FADH₂ ‘den O₂‘ye iki elektron transfer edilerek hidrojen peroksit oluşturmakta, hemen ardından da hidroksil radikaline dönüştürülmesi sonucu bu radikaller yağ asitleri ve diğer bileşiklerini hasara uğratabilmektedir’ (15). Yukarıdan da anlaşılabileceği gibi, oksijen radikallerinin oluşum mekanizmaları karmaşık yollarda çeşitli reaksiyonların gerçekleşmesi ile gelişmektedir.

Manson ve arkadaşları ‘çeşitli çalışmalarca, oksijen serbest radikallerinin iskemik doku hasarlanmasının patogeneğinde rolü olduğu bilgisinin desteklendiğini ‘bildirmişlerdir(18). ‘Yüksek oksidatif stres altında antioksidanların, reaktif oksijen radikallerini ortmadan kaldırma kabiliyeti aşılmış olur’(47). De Celle ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada, kalpte iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmuştur. ‘İskemi-reperfüzyon hasarında moleküler oksijenin aşama aşama redükte olarak çok miktarda

süperoksid anyonu, hidrojen peroksid, ve hidroksil radikali oluşumuna yol açtığı ve bunun sonucunda endojen antioksidanların, oksijen radikallerini ortamdaki temizleyici etkisi aşıldığı' bildirilmiştir(48). 'Bazı antioksidanlar endojen olarak vücutta üretilirken (glutasyon (GSH), ubikunollar, ürik asit), diğerleri de ekzojen antioksidanlar olarak bilinir ve diyet ile alınırlar (vitamin C ve E, yağ asitleri, riboflavin ve karotenoidler)' (14). Buna göre endojen antioksidan üretiminin artırılması ve/veya oluşan reaktif oksijen ürünlerinin azaltılmasına yönelik çeşitli ajanların verilmesine yönelik çalışmaların iskemi-reperfüzyon hasarlanmasını azaltabileceği düşünülmüştür. Bu nedenle birçok çalışma yapılmıştır (2,17,49,50). 'Serbest radikal süpürücülerinin ratlarda, farelerde, kedi ve köpeklerde etkili olduğunun gösterilmiş olması reperfüzyon hasarlanması mekanizmasının türe özgü olmadığını göstermektedir'(18). Bu bilgi ratlarda veya diğer türlerdeki deney hayvanlarında kullanılıp etkinliği gösterilmiş ajanların, insanlarda kullanılması halinde yine etkin olacağı yönünde bir sonuç vermektedir.

2.2.3.1. Serbest Radikaller

'Radikal, dış orbitalinde çiftlenmemiş bir elektronunun olması ile tanımlanan ve kendi orbitalini tamamlamak için başka bir molekülden elektron alarak, bir takım reaksiyonlar zinciri başlatan bir moleküldür' (15). 'Reaktif oksijen radikalleri iki farklı sürecin türevidirler: endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz sistemi ve, nötrofillerdeki Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat (NADPH) oksidaz sistemi'(14). Bu moleküller çok labil olduklarından etraflarındaki farklı dokular ile temasa geçip hasarlanmalarına neden olurlar.

2.2.3.2. Ksantin Oksidaz Sistemi

Ksantin oksidaz sistemi süperoksid ve ksantin oluşumuna yol açarak iskemi reperfüzyon hasarında önemli rol oynayan bir sistemdir. Im ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 'ciltte oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında ksantin oksidaz sisteminin serbest oksijen radikalleri için önemli bir kaynak olduğunu' bildirmişlerdir(51). Angel ve arkadaşlarının yaptığı 'serbest flep yaşamı üzerinde soğuk ve hiperbarik oksijenin kombine etkilerinin araştırıldığı bir çalışmada, antioksidan enzimlerin

hipotermi tarafından korunduğu ve hiperbarik oksijenin ksantin oksidaz aktivitesini inhibe ettiği böylece cilt yaşamının daha iyi olduğu' bildirilmiştir(52). Yine Angel ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada 'serbest radikallerle iskemi dereceleri arasındaki ilişki araştırılmış ve ksantin oksidaz ve malonildialdehid seviyelerinin tüm distal biyopsilerde, proksimal biyopsilere nazaran belirgin olarak daha yüksek olduğu gösterilmiştir'(53). 'Ksantin oksidaz, reaktif oksijen radikali üretimi için önemli bir kaynaktır'(54). 'İskemik dönemde hücrelerin enerji ihtiyaçlarının karşılanabilmesi için anaerobik metabolizma aktif hale gelir'(5). 'ATP parçalanarak AMP'ye ve sonra da hipoksantine dönüşmektedir'(5). 'Hücrenin enerji kaynaklarının giderek azalması sonucunda, hücrenin iyon dengesi bozularak kalsiyum hücre sitoplazmasına girmektedir'(5). 'Hücre içine giren kalsiyum, endotel hücrelerindeki, ksantin dehidrogenazın, ksantin oksidaza dönüşmesini sağlayan sitozolik bir enzimi aktive eder'(5). 'İskemi ilerledikçe oluşan hipoksantin, ksantin oksidaz varlığında ve reperfüzyon sırasında oksijenin de iskemik bölgeye arzı sonucu, süperoksit anyonu ve ksantine dönüşmektedir'(5). Ksantin oksidaz sistemini inhibe eden allopurinolün sistemik olarak verilmesinin ROS oluşumunu azaltmış ve rat cilt fleplerinin yaşama oranını belirgin olarak artırdığı bildirilmiştir (17,51).

2.2.3.3. Nötrofil Akını

İskemi-reperfüzyon hasarlanmasına uğratılan dokularda oluşan hasarın en önemli sebeplerinden birisi nötrofillerin oluşturduğu hasarlanmadır. 'Myeloperoksidaz seviyeleri, dokudaki nötrofil sayısının indirekt göstergesidir'(16). Çetinkale ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada 'iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış ada fleplerinin yaşamında nötrofillerin önemli bir role sahip olduklarını, artmış nötrofil infiltrasyonunun, artmış malonildialdehid ve mieloperoksidaz seviyeleri ile ilişkili olduğunu' bildirmişlerdir(55). Yine, Vries ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada 'iskemi-reperfüzyon hasarının önemli bir özelliğinin nötrofil göçü olduğunu' bildirmişlerdir(56). 'Primer iskemi safhasında trombositler, endotel hücreleri ve diğer lökositler tarafından oluşturulan kemotaktik sinyaller ile nötrofiller inflamasyon bölgesine

yönlendirilirler'(25). 'Reaktif oksijen radikalleri ve metabolitleri de kemotaktik stimulusların oluşmasına neden olurlar'(16). 'İskemik dokuların reperfüzyonu sırasında inflamatuvar mediatörler üretilmekte ve postkapiller venüllerde lökositlerin yuvarlanmasına, adhezyonuna ve göçüne sebep olunmaktadır'(57). 'Ksantin oksidaz ve diğer enzimler tarafından üretilen oksijen radikalleri, iskemi-reperfüzyon hasarının sebep olduğu inflamatuvar yanıtın başlatılması ve büyütülmesinde önemli bir rol oynamaktadır'(57). 'İskemi-reperfüzyon hasarlanması sebebiyle oluşan mikrovasküler disfonksiyondan lökosit-endotel hücre etkileşimlerinin sorumlu olduğu yönündeki kanıtlar artmaktadır'(57). 'Reaktif oksijen radikalleri, başka bazı kaynaklardan olduğu gibi, aktive nötrofillerden de salınmaktadır ve iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında bu salınımın önemli bir rolü bulunmaktadır'(55). 'Nötrofillerin yol açtığı endotel hasarı mikrovasküler bütünlüğün bozulmasına, ödem, tromboz, ve doku nekrozu oluşumuna yol açmaktadır'(58). Yukarıdaki bilgilerin ışığında aslında bu mekanizmaların birbirinden bağımsız olmadıkları ve birbirlerini yakından etkilediği anlaşılmaktadır. Bu etkileşim varlığında iskemi-reperfüzyon hasarlanmasının giderek daha ciddi sonuçlara yol açabilmektedir.

Siemonow ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 'Anti ICAM-1 (anti hücrelerarası adhezyon molekülü-1) monoklonal antikollarının lökosit-endotel etkileşimini azalttığını ve akut mikrovasküler ve parenkimal hasara karşı koruyucu olduğu' bildirilmiştir(59). Çetinkale ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 'iskemi-reperfüzyon hasarına maruz bırakılan rat inguinal ada deri fleplerinde FK506 diye bilinen bir immünsupresif ilacın etkisi araştırılmış ve bu ilacın kullanılmasının flep nekrozunu, malonildialdehid, miyeloperoksidaz seviyelerini ve nötrofil infiltrasyonunu müsbet yönde etkilediğini' bildirmişlerdir(55).

2.2.3.4. Nitrik Oksidin Rolü

'Nitrik oksid önceden endotel kaynaklı relaksing faktör olarak da bilinirdi'(5). 'Nitrik oksid, endotel, polimorfonükleer lökositler vb. gibi birçok yerde, L-arginin'den nitrik oksid sentaz (NOS) enzimi sayesinde üretilmektedir' (5).

Bogdon'un yayınlamış olduğu bir çalışmadan alıntı yapan Kim ve arkadaşları 'nitrik oksidin üretiminin kemotaktik faktörlerin oluşumunu veya aktivitesini engelleyerek nötrofillerin akınını inhibe ettiğini' bildirmiştir(60). Siemionow ve arkadaşlarının, Guo ve arkadaşları ile Lefer ve arkadaşlarının yayınlarından yapmış oldukları alıntıda 'nitrik oksidin doku koruyucu etkisini, vasküler tonusu düzenleyici, trombosit agregasyonu ve endotele lökosit adhezyonunu inhibe edici, serbest radikalleri süpürücü, normal vasküler geçirgenliği sağlayıcı, düz kas proliferasyonunu ve immün sistemi inhibe edici ve endotel hücre rejenerasyonunu stimule edici etkiler sayesinde gerçekleştirebildiğini' bildirmiştir(25). Payne ve arkadaşları yapmış oldukları bir çalışmanın sonuçlarına göre, 'ekzojen kaynaklı nitrik oksid verilerek, reperfüzyona bağlı olarak gelişen barsak mukozası disfonksiyonunu azalttığını' bildirmişlerdir(61). Linas ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 'nitrik oksidin nötrofillerin aracılı akut renal hasarı engellediği' bildirilmiştir(62). Siegfried ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada 'miyokard iskemi ve reperfüzyon hasarlanmasında, nitrik oksid donörlerinin endotel disfonksiyonunu azaltıcı ve kalp koruyucu etkilerinin olduğunu' bildirmişlerdir(63). Weyrich ve arkadaşları kedilerde yaptıkları 'miyokard iskemi-reperfüzyon çalışmasında L-arjininin etkilerini değerlendirmiş ve iskemik kardiyak dokuda endotel fonksiyonunu koruyarak ve nötrofil birikimini azaltarak infarkt alanının azaltıldığı' bildirilmiştir(64). Morikawa ve arkadaşlarının 'spontan hipertansiyonlu ratlar üzerinde yapmış oldukları bir çalışmada ise L-arjininin orta serebral arter okluzyonuna bağlı olarak oluşan infarkt alanını azalttığı' bildirilmiştir(65). Gauthier ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir makalede 'nitrik oksidin iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkisini endotel ahezyon molekülü P-selektin üzerinden postkapiller venüllerde lökosit yuvarlanmasını ve tutunmasını azaltarak gösterdiği sonucuna vardıklarını' bildirmişlerdir(66). Spiecker ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmalarında 'nitrik oksid donörlerinin tümör nekrozis faktör alfa ile indüklenen vasküler hücre adhezyon molekülü(VCAM)-1, intersellüler adhezyon molekülü(ICAM)-1 ve E-selektin ekspresyonunu azalttığını' bildirmişlerdir(67). Lindemann ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada 'nitrik oksidin polimorfonükleer lökositlerin insan damar endotel hücrelerine yapışmasını, (ICAM)-1 mRNA'sını ve yüzey ekspresyonunu inaktive ederek engellendiğini' bildirmişlerdir(68).

‘Nitrik oksid konsantrasyonundaki azalma, vasküler düz kas kasılmasına yol açmakta ve platelet agregasyonu ve damar duvarına adhezyon olmasını stimüle etmektedir’(69).

İskemi-reperfüzyon hasarlanmasında nitrik oksidin müsbet etkileri olduğu sonucuna varan çalışma örnekleri uzatılabilir. ‘Hem potent bir vazodilatör hem de serbest bir radikal olması nedeniyle, nitrik oksidin, flep yaşamını iyi yönde mi yoksa kötü yönde mi etkilediği konusunda uzun süren tartışmalar yaşanmıştır(60). ‘Serbest radikal bir gaz olan nitrik oksidin nöronlar ve endotel hücrelerinden fizyolojik şartlarda üretilmesi durumunda birçok yararlı etkileri mevcut olsa da aşırı miktarlarda bulunması halinde direkt sitotoksositeye veya süperoksit ile reaksiyona girerek sitotoksik etkilere yol açabilmektedir’(70). ‘Flebin periferindeki mikrodolaşım ve flebin canlılığı üzerindeki etkileri bilinmemektedir zira nitrik oksidin çifte fonksiyonu mevcuttur’(70). Meldrum ve arkadaşları, ‘nitrik oksidin hem yararlı hem de zararlı etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir’(71). Kuo ve arkadaşları da nitrik oksidin iskemi-reperfüzyon hasarlanmasındaki rolünün tartışmalı olduğunu, ekzojen nitrik oksidin, oksijen ile reaksiyona girerek dokunun canlılığına karşı ters etkileri olan peroksinitrit oluşumuna neden olduğunu bildirmişler’(72). Gross ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmadan alıntı yapan Meldrum ve arkadaşları ‘nitrik oksidin O_2^- ile birleşerek peroksinitrit ($ONOO^-$) oluşturduğunu, sonrasında da hidroksil radikalleri ve nitrojen dioksitide dönüştüğünü’ rapor etmişlerdir(71). Meldrum ve arkadaşlarının, Allen ve arkadaşlarından yaptıkları alıntıya göre ‘bu ürünlerin lipid peroksidasyonuna neden olduklarını ve akabinde kalsiyum iyonlarının hücre içine akın ettiklerini ve nitrik oksid sentazı indüklediklerini, mitokondrial oksidatif fosforilasyonu bozduklarını ve ksantin oksidaz vasıtası ile O_2^- miktarını artırdıklarını’ bildirmişlerdir(71). Çakatay ve arkadaşları ‘peroksinitritin güçlü ve nisbeten uzun ömürlü bir oksidan ajan olduğunu ve protein moleküllerine de saldırdığını bildirmiştir’(73).

NO’nun birbirine zıt etkileri, NOS’un farklı izoformlarının ekspresyonu sonucu olabilir (71,72). ‘Nitrik oksidin iki izoformu esas (constitutive) NOS (cNOS) ve ‘çözünmeyen(insoluble) NOS’ (iNOS)’ tur’ (71).

‘İskeminin başlangıcında, cNOS yüksek konsantrasyonlarda NO üretilmesini sağlayarak, öncüsü olan L-arjinin’in bölgesel olarak tükenmesine sebep olur’(74). ‘Bunun ardından düşük L-arginine konsantrasyonu nedeniyle, cNOS, nitrik oksid yerine süperoksit

radikali oluşturmaktadır’(74). Kuo ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ‘12 saatlik reperfüzyondan sonra flep iskemi-reperfüzyon hasarlanması ile indüklenen endotel hücre hasarında, lokal veya bölgesel olarak iNOS ve endotelin-1 ekspresyonu ve total endojen plazma nitrik oksid seviyelerinin artmasına flep yaşamının bozulmasına yol açmıştır’(72). ‘Bu gözlemlere göre iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonrası endojen iNOS tarafından nitrik oksid üretilmesinin flep yaşamı üzerine zararlı etkileri olduğu anlaşılmıştır’(72). Bu bilgiler ışığında nitrik oksidin seviyesinden çok cNOS ile mi yoksa iNOS ile mi oluştuğu, iskemi reperfüzyon hasarlanması sürecinde nitrik oksidin yarar mı yoksa zarar mı doğuracağını anlamamıza sebep olur. cNOS ve iNOS seviyeleri immünohistokimyasal yöntem ile ölçülürse ve birbirlerine oranlanırsa, iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonrasında oluşan nitrik oksid seviyelerinin flep yaşamı üzerine olan etkilerinin faydalı yöne mi yoksa zararlı yöne mi yöneldiği hakkında fikir elde edilebilir. Sadece nitrik oksid seviyelerinin ölçülmesinin böyle bir sonuca ulaşılması için yeterli olmadığı kanaatindeyiz.

2.2.4. İskemi-Reperfüzyon Hasarına Karşı Savunma

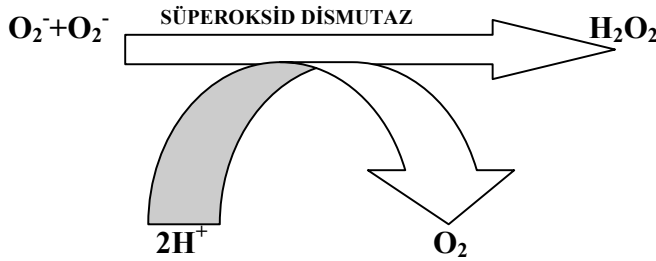
Dokular, metabolik ihtiyaçlarına göre iskemiye yanıt vermektedirler. Transfer edildiğinde greft olarak yaşayabilen dokuların (örneğin cilt greftleri) metabolik ihtiyaçları, ile transfer edildiğinde greft olarak yaşayamayacağından flep olarak transfer edilmesi gereken dokuların (örneğin kas dokusu) metabolik ihtiyaçları birbirinden farklıdır. Bu nedenle ikisinin iskemiye karşı gösterdikleri tolerans da, birbirinden farklıdır. ‘Serbest kas fleplerinde iskemi toleransının araştırıldığı bir çalışmada, üç saatlik iskemi uygulanmasının ardından enerji metabolizmasının hızla düzeldiği ancak dört saatlik iskemi sonrasında ciddi değişikliklerin geliştiği ancak bunların yavaş da olsa geri dönüşümlü olduğu, daha uzun iskemi sürelerinde ise enerji kaynaklarının tamamen kaybedildiği’ bildirilmiştir(76). Francel ve arkadaşları ‘grade 3 açık tibia-fibula kırıklarının serbest kas flepleri ile kapatılmasındaki başarı oranının yaklaşık %90 olduğunu, lokal olarak hipotermi uygulanması sonucunda kas metabolizması ile no-reflow fenomeninin azaltıldığını ve böylece yapılan son 80 kas transferinde yakalanan başarı oranının %100 olduğunu’ bildirmişlerdir(27). Bu çalışma hipotermi uygulanmasının serbest flep cerrahisinde kas

metabolizması ve no-reflow fenomenini azlattığını bildirmiştir(27). Donski ve arkadaşları ‘soğutmanın serbest flep canlılığı üzerindeki etkisini araştırmışlar ve soğuk uygulanması ile iskemik dokunun canlılığının belirgin olarak artırılabilirdiğini’ bildirmişleridir(77).

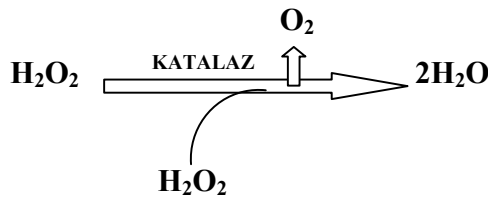
‘Aerobik bir ortamda yaşayan hücreler, serbest radikallerin yok edici etkilerine karşı bu radikalleri ortamdaki kaldırarak, hücrelerin kendilerini savunabilecekleri çeşitli savunma mekanizmaları ile donanmışlardır’(15). ‘Memelilerde üç farklı süperoksid dismutaz izozimi mevcut olup iki molekül süperoksida iki hidrojen iyonu eklenerek bir molekül hidrojen peroksit ve bir molekül oksijen oluşumunu katalizler’(15) (Şekil 3a). ‘Sitozolik süperoksid dismutaz, ekstrasellüler formunda olduğu gibi, aktif bölgesinde bakır/çinko (Cu/Zn) içermekte iken, mitokondrial formu manganez (Mn) içermektedir’(15). ‘Ekstrasellüler süperoksid dismutaz ise plazma, sinoviyal sıvı ve lenf sıvısı gibi interstisiyel alanlarda ve ekstrasellüler sıvılarda mevcuttur’ (78).

‘Peroksizomlarda en yüksek konsantrasyonlarda bulunan ancak, daha az miktarlarda da olsa mitokondri ve sitozolde de yerleşik olan ve hem içeren bir enzim olan katalazın görevi, iki molekül hidrojen peroksitin iki molekül su ve bir molekül suya dönüşümünü sağlamak suretiyle, hidrojen peroksitin nötralizasyonudur’(15). (Şekil 3b)

Şekil 3a



Şekil 3b



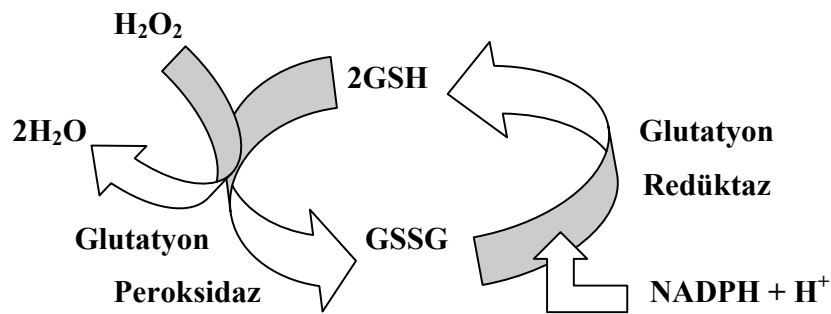
ŞEKİL 3: İskemi-Reperfüzyon hasarlanmasında süperoksid dismutaz ve katalazın tepkimeleri şematize edilmiştir. (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations,

Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.)

Şekil 3a: Süperoksit Dismutazın süperoksit radikallerini hidrojen peroksitde dönüştürmesi şematize edilmiştir. (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.)

Şekil 3b: Katalazın hidrojen peroksidi suya dönüştürmesi şematize edilmiştir. (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.)

Glutasyon peroksidaz, hidrojen peroksidin redüksiyonunu katalizler. ‘Glutasyon peroksidaz, lipid ve organik hidroperoksidlerin de redüksiyonunu katalizler’(78). ‘Bu selenyum içeren enzim, glutasyonun (GSH) sulfhidril gruplarını hidrojen donörü olarak kullanarak glutasyonun okside disulfid (GSSG) formlarının oluşumunu sağlarken, glutasyon redüktaz ise, pentoz fosfat yolunda oluşan NADPH’ı elektron donörü olarak kullanmak suretiyle glutasyonun disulfid formunu tekrar sulfhidril formuna dönüştürür’ (15) (Şekil 4).



ŞEKİL 4: Glutasyon peroksidaz ve glutasyon redüktazın hidrojen peroksit redüksiyonundaki fonksiyonları şematize edilmiştir. (Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations, Thomas M. Devlin, 5. Edition, 2002, Wiley-Liss, New York (15) isimli eser temel alınarak çizilmiştir.)

Katalaz ve glutatyon peroksidaz enzimlerinin ortak olarak redüksiyonunu katalizledikleri yapı hidrojen peroksiddir. Oksidasyon mekanizmalarına karşı vücudun ana savunma mekanizmalarından birisi olan glutatyon peroksidazın selenyum içermesi ve lipid ve organik hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizlemesi iskemi-reperfüzyon hasarlanması gibi klinik durumlarda selenyum takviyesinin önemli ve müsbet sonuçlar doğurabileceğini düşündürmüştür.

2.2.5. Apoptoz/Nekroz

‘Apoptoz ile doku iskemi-reperfüzyonu yakından ilişkilidir’(24,25). ‘Relatif olarak iskemik, oksijen ve besinden fakir bir ortama maruz kalan hücrelerin programlı ölümü (apoptoz), kalan hücrelerin sayısını sınırlandırarak, kısıtlı kaynak için rekabetlerini kolaylaştırmaktadır’(5). Burns ve arkadaşları, ‘apoptozun, reperfüzyonun sonucunda geliştiğini’ bildirmişlerdir(24). ‘İskemi-reperfüzyon hasarlanmasında apoptoz, reaktif oksijen radikallerine bağlı olarak gelişmektedir’(24). ‘Apoptoz tamamen sağlıklı veya ölümcül olmayan şekilde zedelenmiş hücrelerin fizyolojik veya patolojik stimullara bağlı olarak otonom olarak başlatılan ve çok sıkı kontrol edilen bir ölüm sürecidir’(79). ‘Searle ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmadan alıntı yapan Scarabelli ve arkadaşları apoptozda inflamatuvar bir yanıtın oluşmadığını’ bildirmişlerdir(79). Yine Umansky ve arkadaşlarının yayınladığı bir çalışmadan alıntı yapan Scarabelli ve arkadaşları ‘apoptozun aksine, nekrozun genellikle fatal eksternal uyarılara bağlı olarak geliştiğini ve hücre içi içeriklerin etrafa saçılması sebebi ile inflamasyona neden olduğunu’ bildirmişlerdir(79). ‘Reperfüzyon fazı nekrotik hücre ölümünün özellikleri olan inflamasyon, hücre içeriklerinin etrafa bırakılması, hücre ve organel şişmesi ve nükleus kaybı ile karakterizedir’(80). ‘Apoptoz, inter-nukleozomal DNA fragmentasyonu ile karakterize ve aktif olarak düzenlenen hücre ölüm mekanizmasıdır’ (24). ‘Kaspaz kaskadı DNA kırıklarına neden olur’(5). Leist ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmadan alıntı yapan Scarabelli ve arkadaşları ‘iskemiye bağlı olarak oluşan ATP eksikliğinin derecesinin, hücre ölümünün tipi konusunda önemli rol oynadığını’ bildirdi(79). Yine Bradbury ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmadan alıntı yapan Scarabelli ve arkadaşları ‘enerji kaynakları tükenmek üzere ise nekroz geliştiğini,

fakat ATP miktarında daha az miktarda bir tükenme yaşıyorsa apoptotik sürecin başlatılabileceği' bildirilmiştir(79). 'Apoptoz ile nekroz birbirinden, apoptozda intrasellüler içeriklerin hücre içerisinde kalması ile ayrılır ancak, apoptotik hücrelerin gecikmiş veya yetersiz olarak ortamdaki kaldırılması, saatler içerisinde apoptotik artıkların sekonder nekrozuna yol açar'(79).

Jaeschke'nin yayınlamış olduğu bir makalede 'reperfüzyonun ilk saatinde apoptotik hücrelerin sayısında belirgin bir artış olduğunu' bildirdi(80). Gujral ve arkadaşlarının 'ratlarda yapmış oldukları ılık hepatik iskemi-reperfüzyon çalışmasında postiskemik karaciğerlerde reperfüzyon sırasında nekrotik hücrelerin sayısında progresif bir artış olduğu ve baskın olan hücre ölüm tipinin apoptoz değil, nekroz olduğu sonucuna varmışlardır'(81). Gujral ve arkadaşlarının yapmış oldukları bu çalışmada 'apoptotik hepatositlerin sayısının çok sınırlı olduğunu ve tüm hasarlanmış hücrelerin %2'sini kesinlikle aşmadığını' bildirmişlerdir(81).

Özetleyecek olursak Yukarıdaki çalışmalar apoptoza uğrayan hücrelerin tamamen sağlıklı veya ölümcül olmayan şekilde zedelenmiş hücreler olduklarını, apoptozun gerçekleşebilmesi için hücrenin enerji durumunun belirleyici olabileceğini, reperfüzyon sürecinin başlangıcında, muhtemelen iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış hücrelerin, sağlıklı hücrelerdekinden az, ancak tamamen tükenmiş olmaktan daha çok ATP kaynağına sahip olmaları hasebiyle apoptozun belirgin olduğunu; reperfüzyon sürecinin ilerlemesi ile ise ATP kaynaklarının tükenmesine bağlı olarak apoptotik hücrelerin sekonder nekroza uğrayabildiğini düşündürmektedir. Yine yukarıda bildirilen çalışmalar ışığında, reperfüzyon sürecinde hücreler üzerinde oluşan hasarlanmanın artması sonucunda, muhtemelen ATP kaynaklarının tükenmesi nedeniyle nekrotik sürecin tedricen artabileceğini, sürecin sonuna gelindiğinde ise nekrozun apoptozdan daha belirgin olduğunu düşündürmektedir.

2.3. Bir Antioksidan Ajan: Selenyum

'Selenyum, un oluşturulması sırasında kaybolmayan birkaç besinden birisidir ve genellikle diyetle yeterli miktarlarda bulunduğu düşünülmektedir'(15). 'Selenyum,

glutasyon peroksidaz ve tiyoredoksin redüktaz gibi selenoproteinlerin yapısında bulunmaktadır'(15). 'Bu proteinler kendilerine eklenen bir veya daha fazla selenosistein artığı içermektedirler'(15). Gladyshev ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada 'çalışmanın hazırlandığı tarihlere kadar bilinen 12 adet selenoprotein hepsinin selenosistein içerdiğini' bildirmiştir(82).

'İnsanda selenosistein içeren, dokuya özgü ekspresyon gösteren ve farklı substrat özellikleri olan beş tane glutasyon peroksidaz (GPx) izoenzimi olduğu bilinmektedir' (83,84). 'Glutasyon peroksidazların hücreleri oksidatif hasarlanmadan korumak üzere hidrojen peroksid ve organik hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizlediği bilinmektedir'(84). Maiorino ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları çalışmalarında 'üçlü bir katalitik merkez olan selenosistein, glutamine ve triptofan artıklarının bütünlüğü, glutasyon peroksidazların katalitik fonksiyonları için gereklidir'(85). 'Selenyum bağımlı glutasyon peroksidazların tümünde ortak olan bu üçlü, katalitik döngü sırasında oksidasyon ve redüksiyonu ardışık olarak gerçekleştirir'(84). Papp ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmalarından Holger ve arkadaşlarının yapmış oldukları alıntılara göre 'GPx enzimleri arasında, sitozolik GPx (GPx-1), epitele özgü gastrointestinal GPx (GPx-2), hücre dışına salınan plazma GPx (GPx-3), fosfolipid ve kolesterol hidroperoksidlerini redükte eden GPx (GPx-4) ve olfaktor epitel ve embriyonik dokularda bulunan GPx (GPx-6) bulunmaktadır ve GPx'ler antioksidan kapasitelerini, hidrojen peroksidlerin, organik hidroperoksidlerin ve (sadece GPx-4) fosfolipid hidroperoksidlerinin indirgenmesi ile göstermektedir'(84). 'GPx' ın esansiyel bir kısmı olan selenyum, lipid peroksidasyonunun düzenlenmesinde tokoferol ile birlikte sinerjistik olarak hareket eder'(86). 'GPx1 memeliledeki major antioksidan proteinlerden birisidir'(86). 'Memelilerde en yüksek miktardaki selenoprotein olan GPx1, sitozolik bir enzim olup, her tip hücrede eksprese olmakta ve aktivitesi karaciğerdeki selenyumun statüsü ile düzenlenmektedir'(86). 'GPx-4 hem sitozolde hem de mitokondride yerleşiktir'(86). Yagi ve arkadaşlarının yapmış olduğu çalışmada, insan fosfolipid glutasyon peroksidaz geninin eksprese edilmesinin, hücreleri lipid hidroperoksid aracılı hasarlanmadan koruduğu' bildirilmiştir(87). 'Selenoproteinlerin çoğu için selenyumun varlığı, glutasyon peroksidazların biyosentezindeki tek ve en önemli faktördür'(83).

Bjornstedt ve arkadaşlarının yayınladıkları makalede ‘selenoenzim ailesinden tioredoksin redüktazların (TrxRs) lipid hidroperoksidlerinin redüksiyonunu gerçekleştirebildiği sonucuna varmışlardır’(88). ‘Hidroperoksidlerin direkt redüksiyonun yanı sıra, TrxR’lar tioredoksinin redoks halinin kontrolünü sağlayarak reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucudur’(83). Tioredoksin intrasellüler yerleşimli disülfid redükte eden bir enzim olmasının yanısıra, ekstrasellüler olarak da bazı görevleri bulunmaktadır (89). Ottaviano ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada tioredoksin/tioredoksin redüktaz sisteminin antioksidan olarak önemli bir rol oynadığı ve ekstrasellüler olarak da reaktif oksijen radikallerinin miktarını azaltmakta önemli bir görevi olduğu’ bildirilmiştir(90). Bjornstedt ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre ‘ekstrasellüler tioredoksin redüktaz, tioredoksin veya glutoredoksinlerin, selenyum bağımlı plazma glutatyon peroksidazlar (GPx-3) için indirgeyici olduklarını’ bildirilmiştir(91).

‘Selenoprotein P (SeP), insan plazmasındaki major selenoproteindir ve büyük kısmı hepatositlerden salınmaktadır’ (92). Burk ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ‘selenyum eksikliği olan ratlarda selenyum verilmiş, diquat kullanılarak karaciğer nekrozu oluşturulmuş ve lipid peroksidasyonunun ve selenoprotein-P’nin rolleri araştırılmıştır; sonuç olarak selenyum enjeksiyonlarının selenyum seviyelerini artırdığını böylece diquat hasarlanmasına karşı korunma sağlandığını, fakat glutatyon peroksidaz aktivitesinde bir artış saptanmadığını, bu bulguların da selenyumun etkinliğinde selenoprotein P’nin aracı olduğunun gösterdiği’ bildirilmiştir(93). ‘SeP, karaciğerde sentezi yapılan ve selenyum karaciğerden ekstrahepatik dokulara taşıyan bir proteindir’(94). Saito ve arkadaşlarının yapmış oldukları ‘çalışmanın sonuçlarına göre selenoprotein P’nin ekstrasellüler sıvılarda fosfolipid hidroperoksid glutatyon peroksidaz aktivitesi bulunmaktadır’(95). Takebe ve arkadaşlarının yapmış oldukları ‘çalışmada ise tioredoksin selenoprotein P’nin tercih edilen elektron donörü olduğu’ bildirilmiştir(96). Arteel ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada ise ‘selenoprotein P’nin, plazmada peroksinitrit ve onun oluşturduğu oksidasyon ve nitrasyona karşı koruyucu olduğu’ bildirilmiştir(97). Yine, ‘selenoprotein-P, düşük dansiteli lipoprotein (LDL) oksidasyonuna karşı koruyucudur’(98). SeP’nin, N terminali bir selenosistein içermekte ve enzimatik aktivitesini bu yapı ile gösterebilmektedir, C

terminali ise dokuz adet selenosistein içerebilmekte ve selenyum taşıyıcısı olarak görev yapmaktadır(99). Steinbrenner ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir ‘çalışmada selenyum kaybı olan astrositlerde selenoprotein P antioksidan aktivite gösterirken, yeterli selenyum desteği olması durumunda oksidatif strese karşı sitozolik glutatyon peroksidazın koruyucu olduğu’ bildirilmiştir(100). Yang ve arkadaşları ile Koga ve arkadaşlarından alıntı yapan Tapiero ve arkadaşları ‘SeP’nin, kültüre edilmiş astrositler, miyositler, hepatositler ve Leydig hücrelerinde eksprese edildiğini’ bildirmiştir(86).

Az bilinen selenoproteinlerden olan ‘selenoprotein W glutatyon bağımlı antioksidan bir proteindir’(101). ‘Diyette selenyum alınmasındaki eksiklikler, primatlarda ve koyunlarda iskelet ve kardiyak kaslarda kalsifikasyona neden olan beyaz kashastalığına yol açarken, insanlarda Keşan hastalığı kardiyomiyopatisi gelişmesine sebep olmaktadır’(86).

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Çalışma, İnönü Üniversitesi Tıp Fakültesi bünyesinde bulunan, Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinde, Deney Hayvanları Etik Kurul onayı alındıktan sonra gerçekleştirildi. (Tarih: 24.08.2009, Araştırma Protokol Numarası: 2009/18).

Deneyde, ağırlıkları 170-220gr arasında değişen, 7-8haftalık, 24 adet erkek, Wistar albino cinsi rat dahil edildi. Ratlar deney öncesinde, standard rat yemi (Elazığ Yem Fabrikası, Elazığ.) ve su ile beslendi. Deney ortamında 12 saat ışıklı, 12 saat karanlık bir ortamda, 18- 20 C⁰ sıcaklıktaki laboratuvarda gerçekleştirildi.

Anestezi için 50 mg/kg ketamin (Ketalar, Firma adı: Pfizer) ve 5 mg/kg xylasine (Alfazyne%2, Firma adı: Alfasan Woerden-Holland) ratların uyluk arka kaslarının içerisine enjekte edildi. Transvers Rektus Abdominis kas-deri flebi kaldırılarak, oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında selenyumun (Sodyum Selenite-Na₂O₃Se- Ürün kodu: AB109205 , Adres: ABCR GmbH & Co.KG Im Schleht 10 D-76187 Karlsruhe- Mail adres: www.abcr.de) etkinliği araştırılmıştır.

3.1. Deney Protokolü

3.1.1. Operatif Teknik

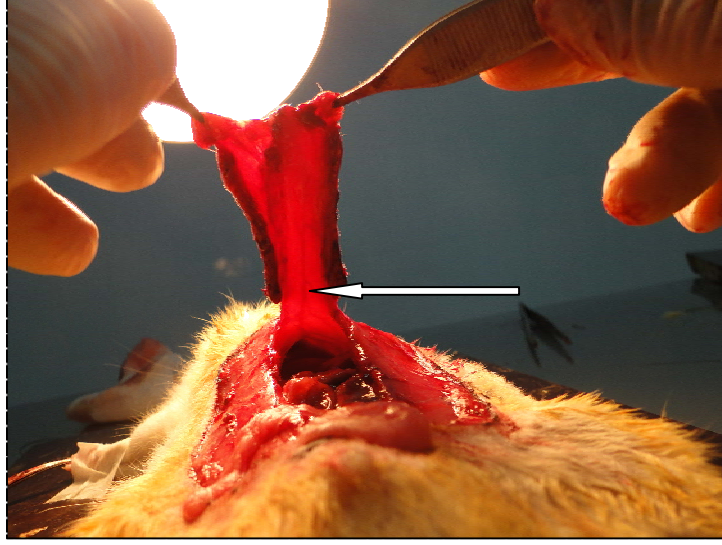
Selenyum grubunda (İ/R+Se) operasyondan iki saat önce intraperitoneal yolla selenyum verildi. Sadece iskemi-reperfüzyon yapılan grupta ise herhangi bir antioksidan

madde enjekte edilmedi. Tüm prosedürler aseptik olarak genel anestezi altında gerçekleştirildi. 50 mg/kg ketamin ve 5 mg/kg xylasine intramuskuler olarak enjekte edildi. Abdomen betadinle (%10 povidon iyot çözeltisi) temizliği takiben traşlandı. Abdomen hazırlanarak 5x4 cm'lik, tek süperior epigastrik arter pediküllü transvers rektus abdominis flebi planlandı (60). Deri adasının aşağı sınırı pubisin yaklaşık 2-2.5 cm yukarısında, yukarı sınırı ise ksifoidin 1 cm aşağısında olacak şekilde (7) ayarlandı. (ŞEKİL 5)



ŞEKİL 5: Çalışmamızda kullanılan ratlarda transvers rektus abdominis kas flebinin planlanması.

Cilt altındaki yağ dokusu da flebe dahil edildi. Karın kaslarının üzerindeki beyazımsı fasya tabakasına ulaşıldı. Deri adasının, alttaki kas tabakasından sıyrılıp ayrılmasına dikkat edildi. Kas planına ulaştıktan sonra, linea alba uzunlamasına kesilerek kas, fasya kılıfından çıkarılmadan yukarıda ksifoid, aşağıda pübise kadar diseke edildi. Kas liflerinin yönünü takip ederek kasın lateral sınırı bulundu ve inferiordan süperiora doğru kas diseke edilip flep kaldırılmış oldu.(ŞEKİL 6)



ŞEKİL 6: Transvers rektus abdominis kas-deri flebinin kaldırılmış hali. Transillüminasyon yöntemi ile flebin pedikülü görülebilmektedir.

Flep kaldırıldıktan sonra ipsilateral süperior epigastrik arter ve ven iskeletize edildi. Kontrateral süperior epigastrik damarlar ve her iki taraf inferior epigastrik damarlar dikiş ile bağlandı. Artık flebi besleyen yalnızca süperior epigastrik sistem kalmıştır. Bu sisteme de mikrodamar klemp konularak 4 saat boyunca iskemi sağlanıp ardından da klemp çıkarılıp reperfüzyon yapıldı.(ŞEKİL 7)



ŞEKİL 7: Transvers rektus abdominis flebinin pedikülü iskeletize edilerek klemplenmiştir.

Flebin bu şekilde kaldırılması Bayramiçli tarafından da belirtilmiştir(7). İntraperitoneal yolla her gün 24. saatte, İ/R+Se grubuna selenyum ve genta injeksiyonu yapılırken, İ/R grubuna sadece genta injeksiyonu yapıldı. Her iki gruptaki ratların yarısı 1. günün (24. saatte) sonunda servikal dislokasyon yoluyla sakrifiye edilip patolojik ve biyokimyasal incelemeler için, 10. günün sonunda ise kalan yarısı sakrifiye edilerek patolojik araştırmalar için laboratuvara ve canlı alan yüzdesinin hesaplanması için gönderildi. Ölmüş veya ölmek üzere olan denekler bu çalışmaya dahil edilmedi.

3.1.2.Çalışma Yöntemi

Bu çalışmada 2 ayrı grup oluşturulmuştur.

Grup 1 (Grup İ/R): Transvers rektus abdominis kas-deri flebi kaldırılarak, 4 saatlik iskemi ve ardından reperfüzyon oluşturuldu. Bu gruptaki ratların yarısı 1. gün sonunda sakrifiye edildi. 1. gün sonunda nitrik oksid, malonildialdehid, glutatyon düzeylerinin ölçümü biyokimyasal yöntemlerle değerlendirilmiş, nötrofil infiltrasyonunun şiddeti değerlendirildi. Gruptaki geri kalan ratlar ise 10. gün sonunda sakrifiye edilerek fleplerdeki canlı alan yüzdesi Auto CAD 2009 (102) programı ile hesaplandı. Ayrıca yeni damar oluşumunun yoğunluğu değerlendirildi. Ağrı kesici verilmedi. Antibyoterapi için, günlük Genta (3 mg/kg) İM injeksiyon yapıldı.

Grup 2 (Grup İ/R+S): Flep kaldırılmadan 2 saat önce 0.625 mg/kg selenyum intraperitoneal yolla verildi. Selenyum verildikten 2 saat sonra 4x5 cm'lik Transvers rektus abdominis kas-deri flebi kaldırıldı. 4 saatlik iskemi ve ardından reperfüzyon oluşturuldu. Postoperatif dönemde selenyum 10 gün boyunca aynı dozda intraperitoneal verildi. Bu gruptaki ratların yarısı 1. gün sonunda sakrifiye edildi. 1. gün sonunda nitrik oksid, malonildialdehid, glutatyon düzeylerinin ölçümü biyokimyasal yöntemlerle değerlendirildi, patolojik olarak da nötrofil infiltrasyonunun şiddeti değerlendirildi. Gruptaki geri kalan ratlar ise 10. gün sonunda sakrifiye edilerek gruplar arasındaki canlı alan yüzdeleri Auto CAD 2009 (102) programı ile hesaplanarak karşılaştırıldı ve histopatolojik incelemeler ile neoanjiogenez yoğunluğu değerlendirildi. Ağrı kesici verilmedi. Antibiyoterapi için, günlük Genta (3 mg/kg) İM injeksiyon yapıldı.

3.1.2.1. Histolojik Değerlendirme Yöntemi

Birinci günün sonunda fleplerin distal kısımlarından alınan spesmenler % 10'luk formalin içerisine yerleştirilmiştir. Yine 10. gün sonunda kaldırılan fleplerin canlı kısımlarının distalinden alınan spesmenler de % 10'luk formalin içerisine yerleştirilerek patoloji laboratuvarına götürülmüştür. Patoloji laboratuvarına getirilen numunelerden kası da içeren küçük parçalar alınıp doku takip işleminden geçirilmiştir. Numuneler daha sonra parafine gömülüp 4-5 mikron kalınlığında kesitler alınmıştır. Alınan kesitler histopatolojik inceleme ve nötrofil sayımı için Hematoksilen Eozin boyası ile boyanmıştır. Boyanan preparatlar ışık mikroskopunda incelenip 1. gün sonunda alınan numunelerden nötrofil infiltrasyonu, 10. gün alınan numunelerden ise neovaskülarizasyon değerlendirilip şiddetine göre skorlanmıştır. Buna göre (-) birkaç, (+) hafif, (++) orta, (+++) şiddetli olarak temsil edilmektedir. Grup 1 ve 2'den alınan spesmenler aynı patolog tarafından kör şekilde değerlendirildi ve ardından patoloji bölümünde gruplarına dağıtıldı. Numunelerin fotoğrafları çekildi.

3.1.2.2. Biyokimyasal Değerlendirme Yöntemi

Grumlardan alınan deri flep numuneleri tartıldı ve üzerlerine %10'luk (w/v) homojenat oluşturacak şekilde fosfat tamponu (pH:7.4, 50 mM) ilave edildi ve buz içinde 1-2 dakika süreyle 12000 devir/dakika homojenize (Ultra Turrax Type T25-B homogenizer, IKA Labortechnik, Germany) edildi. Elde edilen doku homojenatlarının MDA analizleri Ohkawa ve arkadaşlarının (103) tanımladığı metoda göre yapıldı. Geriye kalan homojenatlar 5000 rpm'de, 4°C'de, 30 dakika santrifüj edildi. Elde edilen süpernatant numuneleri MDA, GSH ve Nitrik Oksit analizlerinde kullanıldı.

Süpernatant numunelerine %10'luk TCA çözeltisi ilave edildi, iyice karıştırıldı ve 3000 rpm'de 4°C'de 20 dakika santrifüj edilerek proteinlerin çökmesi sağlandı. Elde edilen açık renkli proteinsiz süpernatant numunelerinin, GSH analizi Ellman (104) metoduna göre yapıldı.

Flep dokularının homojenizasyonu sonrası elde edilen supernatant numuneleri deproteinize edildi. Proteinsiz süpernatant numunelerinin nitrik oksit (NO) düzeyleri, enzimatik Greiss yöntemiyle total nitrit olarak ölçülmüştür. Total nitrit düzeyleri; endojen NO üretiminin indeksi olarak kabul edilmektedir (105,106). Total nitrit ölçümü, Özbek ve ark. tarafından tarif edilen metoda göre yapılmıştır (107).

3.1.2.3. İstatistiki Değerlendirme Yöntemi

Grup 1 ve grup 2 nin (biyokimyasal sonuçları (MDA, NO, GSH) ve canlılık alanları sonuçları SPSS 13,0 windows programında analiz edildi. Ortalama, standart sapma, minimum, maximum değerleri hesaplandı. İki grup karşılaştırmasında normal dağılıma uygun olmayan değişkenlerde non parametrik testlerden manwhitney u testi ve normal dağılım gösteren değişkenleri de parametrik testlerden T- test istatistiği kullanılmıştır. Değişkenlerin homojen özelliklerini belirlemek amacıyla levene istatistiği kullanılmıştır.

4. BULGULAR

4.1. Histolojik Bulgular

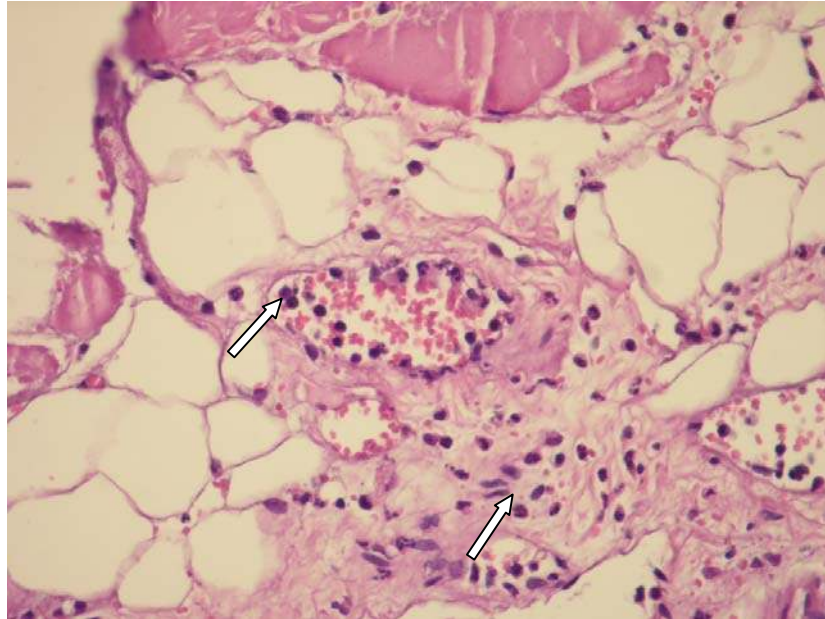
Aynı patolog tarafından kör şekilde değerlendirilen spesmenler nötrofil infiltrasyonunu ve neovaskülarizasyonu şiddetlerine göre sınıflandırılmıştır. Buna göre, grup 1’de nötrofil infiltrasyonu grup 2’ ye nazaran daha yoğun iken, grup 2’de neovaskularizasyon grup 1’e göre daha yoğun olarak değerlendirilmiştir. Grup 1 ve grup 2’nin patolojik bulgularının detayları Tablo 3 ve Tablo 4’te ve Şekil 8, 9, 10, 11, 12’de gösterilmektedir.

TABLO 1: 1. günün sonunda gruplar arasında nötrofil infiltrasyonunun şiddetinin histopatolojik olarak değerlendirilmesi.

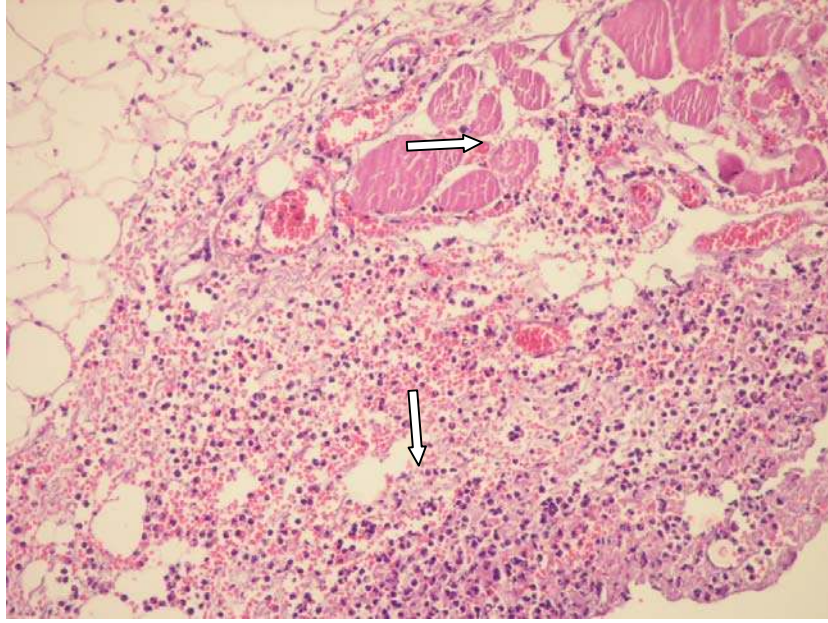
Ratlar	Grup 1- 1. Gün, Nötrofil İnfiltrasyonu	Grup 2- 1. Gün, Nötrofil İnfiltrasyonu
1	+2	+2
2	+3	+2
3	+3	+1
4	+2	+1
5	+2	+3
6	+2	+1
Ortalama	2.3333	1.6666

TABLO 2: 10 günün sonunda gruplar arasında neovaskülarizasyon yoğunluğunun histopatolojik olarak değerlendirilmesi.

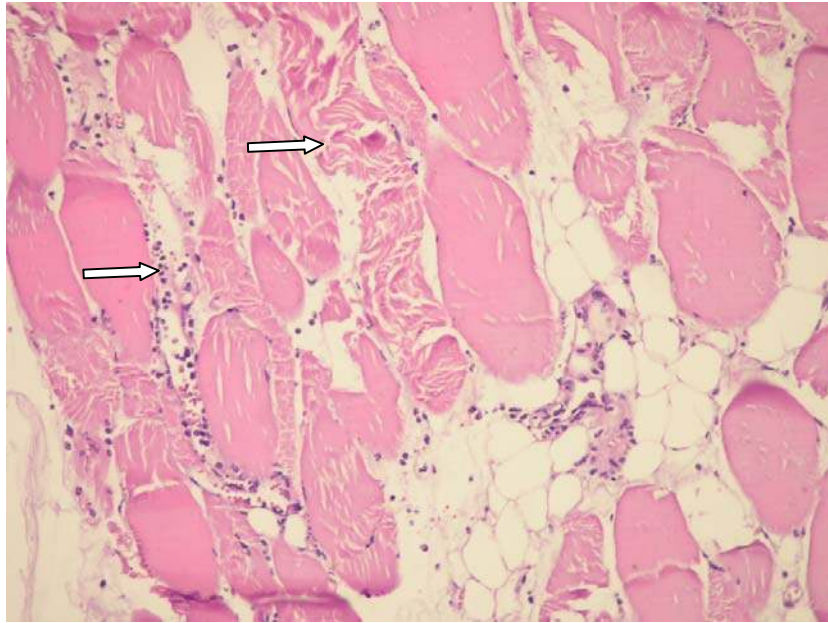
Ratlar	Grup 1- 10. gün, Neovaskülarizasyon	Grup 2- 10. Gün, Neovaskülarizasyon
1	+1	+1
2	+1	+1
3	-	+2
4	-	+2
5	+2	+2
6	+3	+2
Ortalama	1.16666	1.6666



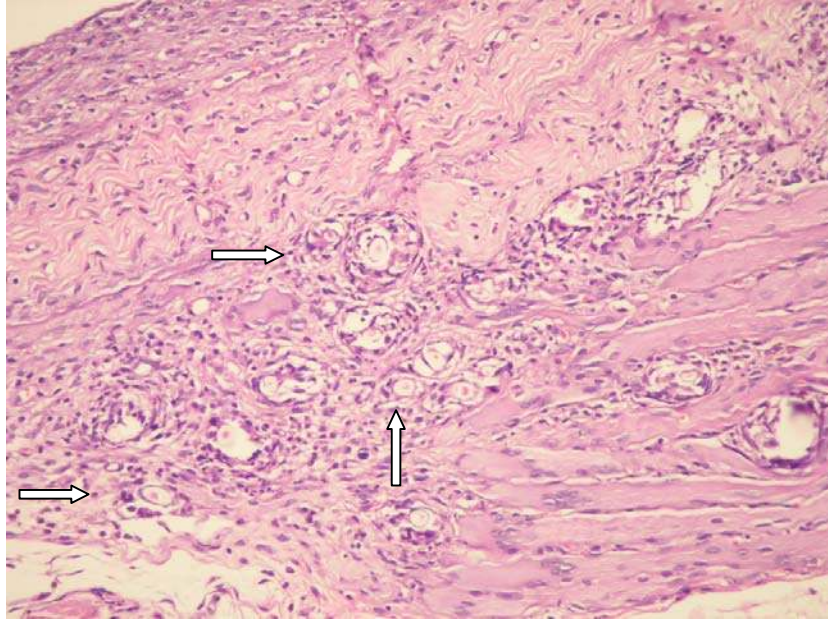
ŞEKİL 8: Grup 1, 1. Gün. Damar duvarında nötrofil adhezyonu ve nötrofil infiltrasyonu.
(H&E x 40)



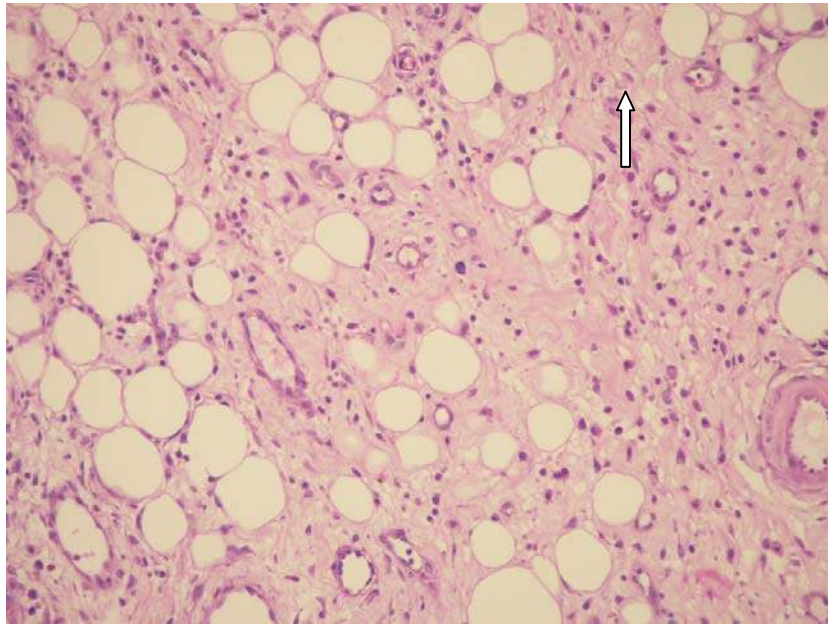
ŞEKİL 9: Grup 1, 1.gün, kas lifleri arasında ve yağ dokusunun içinde şiddetli nötrofil infiltrasyonu.(H&E x 20)



ŞEKİL 10: Grup 2, 1. gün. Kas lifleri arasında hafif nötrofil infiltrasyonu. (H&Ex20)



ŞEKİL 11: Grup 2, 10. gün. orta derecede neovaskularizasyon. (H&Ex20)



ŞEKİL 12: Grup 1, 10. gün. hafif derecede neovaskularizasyon.(H&Ex 40)

4.2. Biyokimyasal Sonuçlar

4.2.1. MDA Sonuçları

Yapılan biyokimyasal değerlendirme sonucunda grup 1’de grup 2’ye nazaran daha yüksek düzeyde MDA seviyeleri görülmüştür. Mevcut dokulardan elde edilen MDA düzeyleri gruplara ayrılıp tablo 5’te gösterilmiştir.

TABLO 3: Her iki gruptaki MDA seviyeleri. Değerler nmol/g yaş doku cinsinden belirtilmiştir.

Ratlar	Grup 1- 1. Gün, MDA Değerleri	Grup 2- 1. Gün, MDA Değerleri
1	6,40	7,40
2	7,30	6,30
3	9,30	4,90
4	7,30	4,50
5	17,40	5,80
6	7,70	6,30
Ortalama	9,2333	5,8666

4.2.2. NO Sonuçları

Yapılan biyokimyasal değerlendirme sonucunda NO düzeyleri açısından grup 1 ve grup 2 arasında birbirine denk sonuçlara rastlanmıştır. Mevcut dokulardan elde edilen NO düzeyleri gruplara ayrılıp tablo 6’da gösterilmiştir.

TABLO 4: Her iki gruptaki nitrik oksid seviyeleri. Değerler nmol/g yaş doku cinsinden belirtilmiştir.

Ratlar	Grup 1- 1. Gün, NO Değerleri	Grup 2- 1. Gün, NO Değerleri
1	39,20	42,10
2	39,20	34,30
3	35,30	41,10
4	44,50	35,80
5	36,80	49,60
6	28,40	42,10
Ortalama	37,2333	40,8333

4.2.3. Redükte Glutasyon Sonuçları

Yapılan biyokimyasal değerlendirme sonucunda GSH düzeyleri açısından grup 1 ve grup 2 arasında birbirine denk sonuçlara rastlanmıştır. Mevcut dokulardan elde edilen GSH düzeyleri gruplara ayrılıp tablo 7’de gösterilmiştir.

TABLO 5: Her iki gruptaki redükte glutasyon seviyeleri. Değerler nmol/g yaş doku cinsinden belirtilmiştir.

Ratlar	Grup 1- 1. Gün, GSH Değerleri	Grup 2- 1. Gün, GSH Değerleri
1	200,00	181,30
2	193,80	193,80
3	187,50	193,80
4	206,30	200,00
5	168,80	168,80
6	187,50	181,30
Ortalama	190,65	186,5

4.3. Canlı Alan Hesaplanması

Flep canlı alan hesaplaması ticari olarak ulaşılabilir bir bilgisayar programı olan (Auto-CAD 2009 programı) kullanılarak yapılmıştır ve yüzdelik cinsinden belirtilmiştir. Grup 2’de, grup 1’e nazaran flep canlılık oranı daha yüksek idi. Mevcut dokularda yapılan hesaplama sonucu fleplerin canlı alan oranları gruplara ayrılıp tablo 8’de gösterilmiştir.

TABLO 6: Her iki gruptaki canlı alan oranının yüzdelik cinsinden hesaplanarak elde edilen sonuçları.

Ratlar	Grup 1- 10. gün Canlı Alan Yüzdesi	Grup 2- 10. gün Canlı Alan Yüzdesi
1	11,59%	75,05%
2	18,83%	82,67%
3	14,98%	79,31%
4	52,71%	92,28%
5	31,52%	95,28%
6	19,92%	75,74%
Ortalama	24,925%	83,38%



ŞEKİL 13: 10. günün sonunda grup 1’deki deneklerden elde edilen bir fotoğraf.



ŞEKİL 14: 10. günün sonunda grup 2’deki deneklerden elde edilen bir fotoğraf.

4.4. İstatistik Sonuçları

4.4.1. MDA Düzeyleri

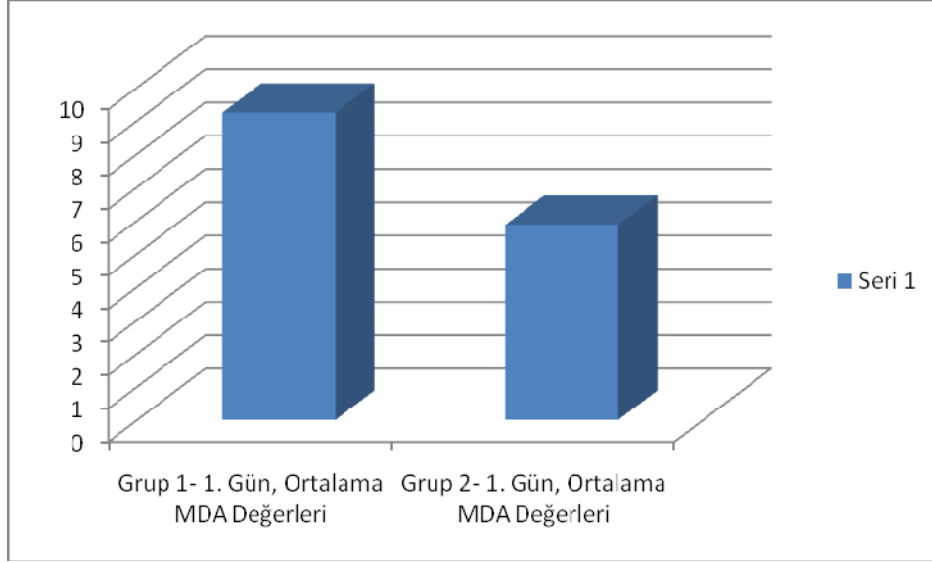
MDA değerleri normal dağılıma uygun olmadığından dolayı SHAPIRO WİLLK test istatistiğine göre $p < 0,05$ olduğundan non-parametrik test istatistiklerinden iki grubu karşılaştırmak için mann-Whitney U test istatistiği kullanılmıştır.

Gruplar arasında MDA değerleri arasında Mann-Whitney U test istatistiğine göre $p < 0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark vardır . Grup 1'deki MDA seviyeleri, grup 2'deki MDA seviyelerine nazaran istatistiki olarak daha yüksektir. Grup 1 MDA ortalama değeri 9,233 iken grup2 nin MDA ortalama değeri 5,867 dir. Grup 1 MDA ortalama değeri grup 2 nin MDA ortalama değerinden 1,574 kat daha fazladır.

TABLO 7: Malonildialdehid seviyelerinin istatistiki olarak değerlendirilmesinde Mann Whitney U test kullanılmıştır ve grup1'deki malonildialdehid seviyeleri grup 2'deki seviyelere nazaran istatistiki olarak anlamlı şekilde daha yüksektir.

	grup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	Mann-Whitney U	<i>p</i> değeri
MDA	1,00	6	9,2333	4,11226	1,67882	3,00	0,015**
	2,00	6	5,8667	1,05198	,42947		

$p < 0,05$ **



ŞEKİL 15: Grup 1 ve grup 2’deki deneklerin ortalama malonildialdehid seviyelerinin şematik olarak gösterilmesi.

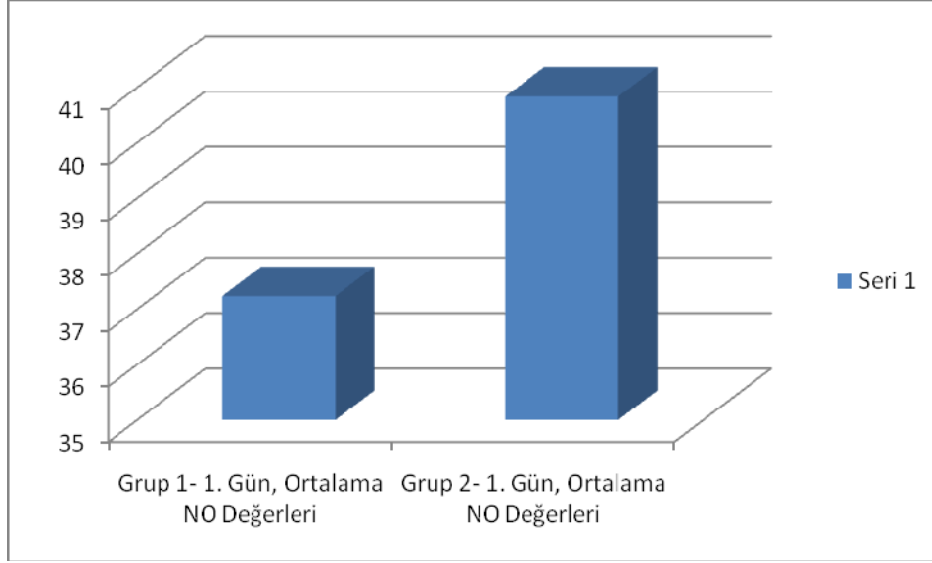
4.4.2. NO Düzeyleri

NO değişkenleri SHAPIRO WİLLK test istatistiğine göre $p > 0,05$ normal dağılıma uygun olduğundan dolayı parametrik testlerden t-test istatistiği kullanılmıştır. Gruplar arasında NO değerleri arasında t-test istatistiğine göre $p > 0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir.

TABLO 8: Nitrik Oksid seviyelerinin istatistiki olarak değerlendirilmesinde t-test istatistiği kullanılmıştır ve grup1 ile grup 2’deki nitrik oksid seviyeleri arasında istatistiki olarak bir fark saptanmamıştır.

	grup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t-test	p değeri
NO	1,00	6	37,2333	5,33841	2,17940	-1,157	0,274
	2,00	6	40,8333	5,44341	2,22226		

$p < 0,05^{**}$



ŞEKİL 16: Grup 1 ve grup 2’deki deneklerin ortalama nitrik oksid seviyelerinin şematik olarak gösterilmesi.

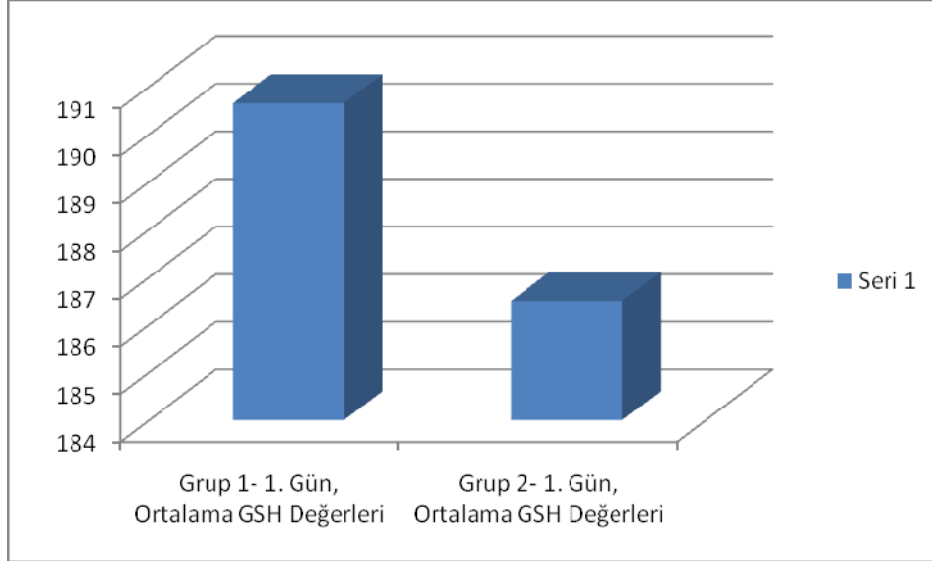
4.4.3. Redükte Glutasyon Düzeyleri

Redükte GSH değişkenleri SHAPIRO WİLLK test istatistiğine göre $p > 0,05$ normal dağılıma uygun olduğundan dolayı parametrik testlerden t-test istatistiği kullanılmıştır. Gruplar arasında GSH değerleri arasında t-test istatistiğine göre $p > 0,05$ olduğundan istatistiksel olarak anlamlı fark belirlenmemiştir.

TABLO 9: Redükte glutasyon seviyelerinin istatistiki olarak değerlendirilmesinde t-test istatistiği kullanılmıştır ve grup1 ile grup 2’deki redükte glutasyon seviyeleri arasında istatistiki olarak bir fark saptanmamıştır.

	grup	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error Mean	t-test	pdeğer i
GSH	1,00	6	190,6500	12,95789	5,29004	0,058	0,570
	2,00	6	186,5000	11,45600	4,67689		

$p > 0,05$



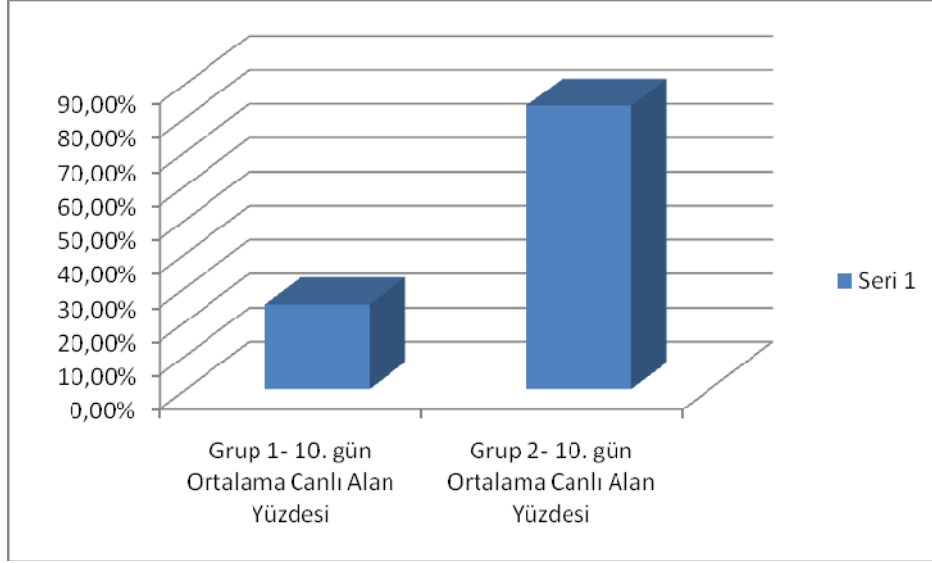
ŞEKİL 17: Grup 1 ve grup 2’deki deneklerin ortalama redükte glutatyon seviyelerinin şematik olarak gösterilmesi.

4.4.4. Canlı Alan Oranı

TABLO 10: Canlı alan oranının istatistiki olarak değerlendirilmesinde t-test istatistiği kullanılmıştır ve grup1’deki canlı alan oranı grup 2’deki canlı alan oranından istatistiki olarak belirgin şekilde daha küçüktü.

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum	t değeri	F değeri	P değeri
1,00	6	24,9250	15,19490	11,59	52,71			
2,00	6	83,3050	8,64296	75,05	95,28	-8,18	1,134	0,0001
Total	12	54,1150	32,68667	11,59	95,28			

Canlılık düzeyleri için veriler SHAPIRO WİLLK test istatistiğine göre $p > 0,05$ normal dağılıma uygun olduğundan dolayı parametrik testlerden t-test istatistiği kullanılmıştır. grup 1 ve grup 2 arasında istatistiksel olarak canlılık düzeyleri yönünden t-test istatistiğine göre anlamlı fark vardır ($p = 0,0001$, t test= -8,18). Grup 2’deki canlı alan yüzdesi, grup 2’deki canlı alan yüzdesinden istatistiki olarak daha çoktur.



ŞEKİL 18: Grup 1 ve grup 2’deki deneklerde elde edilen ortalama canlı alan oranlarının şematik olarak gösterilmesi.

5.TARTIŞMA

Organ transplantasyonu, serbest flep transferi veya replantasyonlarda, iskemi ve reperfüzyon operasyon sırasında mutlaka gerçekleşmektedir. ‘Serbest flep cerrahisinde, iskemi ve reperfüzyon, her zaman serbest flebin bir bölgeden başka bir bölgeye transplantasyonu sırasında oluşur, cerrahi prosedürün bir aşamasıdır ve engellenemez’(14). ‘Bu süreye/mekanizmaya primer iskemi denir’(14). ‘Primer iskemi besleyen vasküler pedikülün klemplenmesi ile başlar ve reperfüzyonun sağlanması ile sona erer’ (14). ‘Kas dokusu, daha aktif bir metabolizması olduğundan primer iskemiden en çok etkilenen doku tipidir’(25). ‘İskemi reperfüzyonun akabinde oluşan herhangi bir dolaşım bozucu olay sekonder iskemi olarak bilinir’(14). ‘Sekonder iskeminin nedeni, genellikle zayıf cerrahi tekniktir’(14). ‘Sekonder iskemi, cerrahin mikrocerrahi becerilerini geliştirmesi ile önlenabilir’ (14).

‘İskemik dokuların kurtarılması için kan akımının yeniden sağlanması şarttır ancak reperfüzyon, iskemik dokuların daha da hasarlanmasına neden olan ve iskemi-reperfüzyon hasarlanması olarak isimlendirilen bir sürece yol açabilir’(39). ‘İskemi-reperfüzyon hasarında lipid peroksidasyonunun, total antioksidan aktiviteye oranı artmaktadır ve bu durum oksidatif stresi işaret etmektedir’(45). ‘Serbest radikaller direkt sitotoksik olmalarının yanı sıra, kalsiyum ile birlikte, platelet aktive edici faktör ve lökotrien B4 gibi çeşitli proinflamatuvar lipid mediatörlerinin yanı sıra kompleman C5a, tümör nekrosis faktör alfa ve interlekin 1 beta gibi peptid mediatörlerinin sentezini tetikler’(46). Bu bilgi bizlere iskemi-reperfüzyon hasarlanmasının aslında sadece lokal bir hadise olmadığını,

hadisenin büyümesine yol açan kemotaktik faktörlerin devreye girdiğini ve iskemi-reperfüzyon hasarlanmasına yol açan mekanizmaların birbirleriyle etkileşip sürecin daha da büyümesine yol açtıklarını düşündürmektedir. ‘İskeminin direkt etkilerinin yanısıra, oksijenin bu dokulara yeniden arzı gerçekleşince (reperfüzyon) ve süperoksid (O_2^-), hidrojen peroksid, ve hidroksil radikali (OH) gibi oksijen radikalleri oluşunca etkilenen dokuların uğramış olduğu hasar daha da artar’(15). ‘Reperfüzyon sırasında oluşan ROS, endotel hücrelerinde şişme, vazokonstrüksiyon ve artmış kapiller geçirgenlik gibi değişikliklere yol açarak mikrodolaşımı bozar’ (14). Aslında iskemi-reperfüzyon hasarlanması birden çok mekanizmanın birbirleriyle etkileşerek hasarlanmayı daha da büyüten karmaşık bir hadisedir. Antioksidan etkinliği olduğu bilinen ajanlarla iskemi-reperfüzyon hasarının engellenebilmesi veya etkilerinin azaltılabilmesi için birçok çalışma yapılmıştır (2,17,49,50).

‘Selenyum, glutatyon peroksidaz ve tioredoksin redüktaz gibi selenoproteinlerin yapısında bulunmaktadır’ (15). ‘İnsanda selenosistein içeren, dokuya özgü ekspresyon gösteren ve farklı substrat özellikleri olan beş tane glutatyon peroksidaz (GPx) izoenzimi olduğu bilinmektedir’(83,84). Maiorino ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları çalışmalarında ‘üçlü bir katalitik merkez olan selenosistein, glutamine ve triptofan artıklarının bütünlüğünün glutatyon peroksidazların katalitik fonksiyonları için gerekli olduğu’ bildirilmiştir(85). Papp ve arkadaşlarının yayınladıkları çalışmalarından Holger ve arkadaşlarının yapmış oldukları alıntılara göre ‘GPx enzimleri arasında, sitozolik GPx (GPx-1), epitele özgü gastrointestinal GPx (GPx-2), hücre dışına salınan plazma GPx (GPx-3), fosfolipid ve kolesterol hidroperoksidlerini redükte eden GPx-4 ve olfaktor epitel ve embriyonik dokularda bulunan GPx-6 bulunmaktadır ve GPx’ler antioksidan kapasitelerini, hidrojen peroksidlerin, organik hidroperoksidlerin ve (sadece GPx-4) fosfolipid hidroperoksidlerinin indirgenmesi ile göstermektedir’(84). ‘Glutatyon peroksidazların hücreleri oksidatif hasarlanmadan korumak üzere hidrojen peroksid ve organik hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizlediği bilinmektedir’(84).

Bjornstedt ve arkadaşlarının yayınladıkları makalede ‘selenoenzim ailesinden tioredoksin redüktazların (TrxRs) lipid hidroperoksidlerinin redüksiyonunu gerçekleştirebildiği sonucuna varmışlardır’(88). ‘Hidroperoksidlerin direkt redüksiyonun

yanı sıra, TrxR'lar tiyoredoksinin redoks halinin kontrolünü sağlayarak da reaktif oksijen radikallerine karşı koruyucudur'(83). Bu tiyoredoksin redüktazların iki şekilde antioksidan kapasite gösterdiğine işaretir.

'Selenoprotein P (SeP), insan plazmasındaki major selenoproteindir ve büyük kısmı hepatositlerden salınmaktadır'(92). Saito ve arkadaşlarının yapmış oldukları 'çalışmanın sonuçlarına göre selenoprotein P'nin ekstrasellüler sıvılarda fosfolipid hidroperoksid glutasyon peroksidaz aktivitesi gösterdiği bildirilmiştir'(95). Arteel ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada da 'selenoprotein P'nin, plazmada peroksinitrit ve onun oluşturduğu oksidasyon ve nitrasyona karşı koruyucu olduğu' bildirilmiştir(97). Az bilinen selenoproteinlerden olan 'selenoprotein W, glutasyon bağımlı antioksidan bir proteindir'(101). Bütün bu çalışmalar selenyumun, farklı GPx izoenzimleri, tiyoredoksin redüktaz enzimi ve çeşitli selenoproteinlerin yapısında bulunmaları sayesinde antioksidan etkinliğini gösterebildiği anlaşılmaktadır.

Gerek iskemi-reperfüzyon hasarının oluş mekanizmaları, gerekse önlenmesine yönelik çok sayıda deneysel çalışmalar yapılmıştır. 'Serbest radikal süpürücülerinin ratlarda, farelerde, kedi ve köpeklerde etkili olduğunun gösterilmiş olması reperfüzyon hasarlanması mekanizmasının türe özgü olmadığını göstermektedir'(18). Bu durumda ratlarda veya başka türlerde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında etkinliği kanıtlanmış antioksidan ajanların veya reaktif oksijen radikallerinin ortamdan süpürülmesinde etkili olan ajanların insanlarda da etkin olması beklenmelidir. 'Reaktif oksijen radikalleri ve metabolitleri de kemotaktik stimulusların oluşmasına neden olurlar'(16). Çetinkale ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada 'iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış ada fleplerinin yaşamında nötrofillerin önemli bir role sahip olduklarını, artmış nötrofil infiltrasyonunun, artmış malonildialdehid ve miyeloperoksidaz seviyeleri ile ilişkili olduğunu' bildirmişlerdir(55). Yine, Vries ve arkadaşlarının yayınlamış oldukları bir çalışmada 'iskemi-reperfüzyon hasarının önemli bir özelliğinin nötrofil göçü olduğunu' bildirmişlerdir(56).

Mevcut tedaviler klinikte rutin kullanıma girmediğinden rutin kullanıma girebilecek ajanların araştırılması gerekmektedir. Bir ajanın klinikte rutin kullanıma girebilmesi için ucuz, etkili ve kullanımı pratik bir ajan olması gerekmektedir. Önceden selenyumun

iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkisi çeşitli çalışmalarda gösterilmiştir (1,2,108). Ancak literatürde selenyumun fleplerde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarındaki etkinliğine dair şimdiye kadar herhangi bir çalışmaya rastlanmamıştır. İskemi-reperfüzyon hasarında birden fazla mekanizmanın reaktif oksijen türlerinin oluşumundan sorumlu olduğunu biliyoruz. ‘Reaktif oksijen radikalleri iki farklı sürecin türevidirler: endotel hücrelerindeki ksantin oksidaz sistemi ve nötrofillerdeki Nikotinamid Adenin Dinukleotid Fosfat (NADPH) oksidaz sistemi’(14). Bu mekanizmaların birbirleri ile bağlantıları olsa da ayrı ayrı mekanizmalardır. Ancak süreç ilerleyince her mekanizma birbirini etkilemeye başlar ve süreç giderek geri dönüşümsüz bir hal alır. İ/R’na karşı başarılı olduğu bildirilmiş her ajan farklı mekanizmaların üzerine etki ederek serbest radikal oluşumunu ve ortama salınımını inhibe eder ve/veya ortamdan süpürülmesini-detoksifiye edilmesini sağlar.

‘GSH(Glutatyon)’un vücudu oksidatif strese koruyan en önemli antioksidanlardan birisi olduğu’ bildirilmiştir (14). Bjornstedt ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada elde edilen sonuçlara göre ‘ekstrasellüler tiyoredoksin redüktaz, tiyoredoksin veya glutoredoksinlerin, selenyum bağımlı plazma glutatyon peroksidazlar (GPx-3) için indirgeyici oldukları’ bildirilmiştir(91).

Bizim çalışmamızda, GSH miktarında gruplar arasında istatistiksel bir değişiklik saptanmamıştır. ‘Glutatyon peroksidaz, lipid ve organik hidroperoksidlerin redüksiyonunu katalizler’(78). ‘Bu selenyum içeren enzim, glutatyonun (GSH) sulfhidril gruplarını hidrojen donörü olarak kullanarak glutatyonun okside disülfid (GSSG) formlarının oluşumunu sağlar’(15). GSH iskemi-reperfüzyon hasarında H₂O₂’nin ortamdan uzaklaştırılabilmesi için, glutatyon peroksidaz ve redüktaz tarafından sürekli yükseltgenip indirgenmektedir. Bu glutatyonun bir son ürün olmadığını göstermektedir. Bu sebeple redükte veya okside glutatyon seviyelerinin flep canlılığının belirleyicilerinden biri olmayabileceği kanısındayız.

Zapletal C. ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ‘karaciğerde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonrası selenyum tedavisinin, karaciğer mikrodolaşımı üzerine etkisinin değerlendirilmesi amaçlanmıştır’ (1). ‘Selenyum grubunda mevcut ratlara 375 µg/100 g selenyum (Selenase, Fa. Biosyn), iskemi-reperfüzyondan 30 dakika önce iv yolla verilmiştir’(1). ‘Tüm ratların sol karaciğer lobuna 70 dakika ılık

iskemi ve ardından 30 dakika boyunca reperfüzyon uygulanmıştır'(1). 'İntravital mikroskopi yapılmış, sinusoid ve venüllere yapışma (adherans) gösteren lökositlerin miktarı, sinusoid ve postsinusoidal venüllerdeki lökosit hızları değerlendirildi'(1). 'İntravital mikroskopik analizlerde parametreler arasında belirgin farklılıklar mevcuttur'(1). 'Selenyum verilen grupta düzenli perfüze edilen sinusoidlerin yüzdesi (oranı) artmış ve sinusoid ve venüllerde yapışmış lökosit sayılarında azalma görülmüştür'(1). 'Selenyum verilen grupta, sinusoid ve postsinusoidal venüllerde lökositlerin hesaplanan hızlarının daha yüksek olduğu gözlenmiştir'(1). 'Kontrol hayvanlarındakinin aksine, mikrodolaşımda belirgin olarak düzelme gözlenmiştir'(1). 'ALT seviyeleri belirgin olarak azalmış, malonildialehid seviyeleri ise değişmeden kalmıştır'(1). 'Karaciğer dokusunda, total ve redükte glutatyon miktarında artış oluşturulan okside glutatyon miktarında değişiklik gözlenmemiştir'(1). 'Bu etkilerin GPx aktivitesinden ziyade selenitin kendisi ve selenoprotein P tarafından gerçekleştirilmiş olduğu düşünülmüştür'(1). 'Bu bulgular ışığında otörler, karaciğerde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarında sodyum selenit kullanımının karaciğer mikrodolaşımını kontrol grubuna nazaran iyileştirdiği sonucuna' varmışlardır(1).

'İskemik dokuların reperfüzyonu sırasında inflamatuvar mediatörler üretilmekte ve postkapiller venüllerde lökositlerin yuvarlanmasına, adhezyonuna ve göçüne sebep olmaktadır'(57). 'Reaktif oksijen radikalleri, başka bazı kaynaklardan olduğu gibi, aktive nötrofillerden de salınmaktadır ve iskemi-reperfüzyon hasarlanmasında bu salınımın önemli bir rolü bulunmaktadır'(55). Siemonow ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 'antiadhezyon (ICAM-1) monoklonal antikörlerinin lökosit-endotel etkileşimini azalttığını ve akut mikrovasküler ve parenkimal hasarlanmaya karşı koruyucu olduğu' bildirilmiştir(59). Yapmış olduğumuz bu çalışmada, 24. saatte alınan doku spesimenleri patoloji bölümünce değerlendirilmiştir. Patolojik değerlendirmeler sonucu nötrofil infiltrasyonunun şiddetinin grup 1'de, grup 2'ye nazaran daha yoğun olduğu sonucuna varılmıştır. Nötrofil infiltrasyonunun engellenmesi, selenyumun iskemi reperfüzyon hasarını baskılamasındaki en önemli mekanizmalardan birisidir.

Tanguy S ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada 'iki grup oluşturularak miyokardda iskemi-reperfüzyon hasarlanması oluşturulmuş, iki gruptan birisine yüksek doz

(1.5 mg/kg/gün), diğerine de düşük doz (0.05mg/kg/gün) selenyum 10 hafta boyunca verilmiştir'(109). 'Bölgesel iskemi-reperfüzyon hasarı yapılan ratlarda diyetle yüksek doz selenyum alınmasının rat miyokardında infarkt boyutunu azalttığı, plazma glutatyon peroksidaz aktivitesini artırdığını, postiskemik GSH/GSSH oranını koruduğunu ve postiskemik ortalama arter basıncını iyileştirdiğini rapor etmiştir' (109).

Danjing L. ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir 'çalışmada selenyumun insan glutatyon peroksidaz enzimi üzerindeki etkisi araştırılmıştır'(110). 'Bu çalışmada atrial septal defekt ve ventriküler septal defekti mevcut olan hastalara ameliyat öncesindeki yedi gün boyunca günde 400 µg selenyum desteği yapılmış ancak, malondialdehid (MDA) seviyelerinde kontrol grubu ve selenyum desteği verilen gruplar arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark oluşmadığını, selenyum desteğinin miyokard selenyum içeriğini arttırdığını, iskemi-reperfüzyon hasarında glutatyon peroksidaz gen ekspresyonunu arttırdığını bildirmişlerdir'(110). 'Fakat, glutatyon peroksidaz aktivitesinin ortalama değerinin, selenyum desteği yapılan grupta kontrol grubundakine nazaran, hafif daha düşük olduğunu bildirilmiştir'(110). 'Bu çalışmada lipid peroksidasyonunun ürünü olan malondialdehid (MDA), selenyum desteği yapılan grupta % 4.2 değerinde azalırken, kontrol grubunda % 8.2 değerinde artmıştır ancak bu değerlerin istatistiki olarak anlamlılığı bulunmamaktadır' (110). MDA seviyelerinin istatistiki olarak anlamlı bulunmamasının sebebi selenyum desteğinin sadece ameliyat öncesinde verilmesi olabilir. 'Bu sonuçlara göre iskemi-reperfüzyon hasarlanmasının öncesinde selenyum desteği verilmesi, glutatyon peroksidaz (GPx-1) aktivitesini artırmamaktadır'(110). 'Yine ameliyat öncesinde selenyum desteğinin yapılmasının kan hücreleri ve serumdaki selenyum içeriğini artırmamaktadır; bu fazla olan selenyumun kanda depolanmadığının göstergesidir'(110). 'Kontrol grubunda reperfüzyon sonrasındaki 30. dakikada, reperfüzyon öncesine nazaran miyokarda saptanan düşük selenyum seviyeleri, selenyum tüketiminin olduğunu ve selenyumun zamanında yerine geri konulamadığını göstermektedir'(110). 'Selenyum grubundaki miyokard selenyum içeriği iskemi öncesinde kontrol grubuna nazaran daha yüksek idi'(110). 'Reperfüzyon sonrasındaki 30. dakikada, reperfüzyon öncesine nazaran selenyum seviyelerinin iki kat artmış olduğu' gösterilmiştir(110). 'Bu sonuç, cerrahi öncesi

yapılan selenyum desteğinin, talebi karşılamak üzere selenyum mobilizasyonunu artırdığını gösterir' (110).

Öztürk C. ve arkadaşları deneysel intestinal iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulan bir modelde selenyumun bağırsak morfolojisi, lipid peroksidasyonu, ve bakteriyel translokasyon üzerindeki etkilerini araştırmıştır(111). 'Şam grubunda sadece laparotomi yapılırken, iskemi-reperfüzyon grubunda superior mezenterik arter 30 dakika boyunca mikrovasküler klemp ile tıkanmıştır'(111). 'Üçüncü grupta operasyon öncesindeki üç gün boyunca selenyum desteği verilmiş ve sadece laparotomi yapılmıştır'(111). 'Dördüncü grupta ise sodyum selenat intraperitoneal olarak cerrahi öncesinde üç gün boyunca verilmiş ve iskemi-reperfüzyon grubundaki işlemin aynısı uygulanmıştır'(111). '24 saat sonra steril koşullarda karaciğer, dalak, ve mezenterik lenf nodlarından doku örnekleri elde edilmiştir'(111). 'Selenyum takviyesi yapılmış olan grupta iskemi-reperfüzyona bağlı bakteriyel translokasyonun ve bağırsak hasarlanmasının önlendiği gösterilmiştir'(111). 'Selenyum tedavisi verilmiş ve iskemi reperfüzyon hasarlanmasına maruz bırakılmış ratlarda, ileum spesmenlerindeki doku MDA seviyelerinin, sadece iskemi-reperfüzyon hasarlanması yapılan grupla karşılaştırıldığında belirgin olarak daha düşük olduğu tespit edilmiştir'(111). 'Bu çalışma sonucunda, selenyum ile önceden yapılan tedavinin lipid peroksidasyonunu azalttığı ve böylece intestinal mukozal bütünlüğün korunduğu gösterilmiştir'(111).

Bizim çalışmamızda da hücre membranının yapısında da bulunan lipidlerin, iskemi-reperfüzyon hasarı sonrası, lipid hasarlanmasının kantitatif göstergesi olarak malonildialdehid seviyeleri ölçülmüştür. Çalışmamızda, selenyum preoperatif tek doz, ve postoperatif 10 gün boyunca intraperitoneal olarak verilmiştir. Selenyum, bu ölçümlerin sonucunda grup 2'de grup 1'e nazaran lipid peroksidasyonunun göstergesi olan malonildialdehid seviyelerini istatistiki olarak anlamlı miktarda düşürerek azalmasına yol açmıştır. Bu sonuç selenoproteinlerin ve glutatyon peroksidaz izoenzimlerinin etkisine bağlanabilir. Danjing ve arkadaşlarının elde ettikleri MDA sonuçlarından farklı olarak, bizim çalışmamızda selenyum takviyesi yapılan grup ile kontrol grubu karşılaştırıldığında düşük selenyum seviyeleri elde edilmesinin sebebi iki çalışma arasında selenyum enjeksiyon zamanlaması ile ilgili yöntem farkından kaynaklanıyor olabilir. Öztürk C ve

arkadaşlarının yapmış olduğu bu çalışmada da iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturmada önceki üç gün boyunca selenyum takviyesi yapılmış olmasına rağmen selenyumun başarılı sonuç vermesi tartışmalı bir noktayı ortaya koymaktadır..

Burk ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir çalışmada ‘selenyum eksikliği olan ratlarda selenyum verilmiş, diquat kullanılarak karaciğer nekrozu oluşturulmuş ve lipid peroksidasyonunun ve selenoprotein-P’nin rolleri araştırılmıştır; sonuç olarak selenyum enjeksiyonlarının selenoprotein P seviyelerini artırdığı, böylece diquat hasarlanmasına karşı korunma sağlandığı, fakat glutatyon peroksidaz aktivitesinde bir artış saptanmadığı, bu bulguların da selenyumun etkinliğinde selenoprotein P’nin aracı olduğunu işaret ettiği’ bildirilmiştir(93). Steinbrenner ve arkadaşlarının yapmış oldukları bir ‘çalışmada selenyum kaybı olan astrositlerde selenoprotein P antioksidan aktivite gösterirken, yeterli selenyum desteği olması durumunda oksidatif strese karşı sitozolik glutatyon peroksidazın koruyucu olduğu’ bildirilmiştir(100).

Özbal ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada da ratlarda serebral iskemi-reperfüzyon hasarlanması üzerine selenyumun etkinliği değerlendirilmiştir. ‘Bu çalışmada ratlar üç gruba ayrılmıştır’(108). ‘Buna göre sham grubu, iskemi-reperfüzyon grubu ve iskemi-reperfüzyon + selenyum desteği verilen gruplar idi’(108). ‘Selenyum desteği verilen grupta ilk selenyum dozu anestezinin indüksiyonu ile verilmiş ve selenyum verilmesine 14 gün boyunca devam edilmiştir’(108). ‘Bu çalışmada iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış prefrontal korteks ve hipokampal alanlarının üzerinde selenyumun etkisi araştırılmıştır’(108). ‘Histopatolojik değerlendirme, ratlarda iskemi hasarından sonra verilen selenyumun belirgin olarak prefrontal korteks ve hipokampal CA1 bölgelerde iskemi-reperfüzyona bağlı nöronal ölümü azaltmış olduğu gösterilmiştir’(108).

Seema Yousuf ve arkadaşlarının yaptıkları bir çalışmada selenyumun rat hippocampusünde serebral iskemi ile indüklenen nöronal hasarlanmada oynadığı rol değerlendirilmiştir. ‘Bu çalışmada serebral iskemi uygulanan Wistar ratlarında operasyondan yedi gün önce yapılan selenyum tedavisinin hippocampüsteki bozulmuş mitokondriyal ATP içeriği, sinaptozomlardaki intrasellüler kalsiyum, heat stress protein, ve kaspaz-3 aktivitesi üzerine olan etkisi, histopatolojik değişiklikler ile nörodavranışsal bozukluklar üzerine olan etkinliği araştırılmıştır’(2). ‘İki saatlik bir serebral iskemi süresi sonrası 22 saat boyunca

reperfüzyon uygulandı'(2). 'Operasyon öncesindeki 7 gün boyunca 0.1 mg/kg dozunda selenyum takviyesi alan ratların iskemi grubundakilerle karşılaştırıldığında ATP, kalsiyum, heat stress protein, kaspaz-3 seviyelerinde ve davranışsal olarak düzelmeye yönelik belirgin bir trend olduğu gözlenmiştir'(2). 'Yine, selenyum takviyesi + iskemi-reperfüzyon uygulanan grupta, sadece iskemi-reperfüzyon yapılan gruba nazaran daha az ödem oluştuğuna dair histolojik bulgularla karşılaşılmıştır'(2). Otörler, 'bu çalışmada selenyumun iskemik penumeral bölgedeki nöronların kurtarılaraq iskemik hücre ölümünü sınırlandırabileceğini' bildirmektedir(2).

'Nitrik oksid konsantrasyonundaki azalma, vasküler düz kas kasılmasına yol açmakta ve platelet agregasyonu ve damar duvarına adhezyon olmasını stimüle etmektedir'(69). Meldrum ve arkadaşları, 'nitrik oksidin hem yararlı hem de zararlı etkilerinin olduğunu bildirmişlerdir'(71). Kuo ve arkadaşları da nitrik oksidin iskemi-reperfüzyon hasarlanmasındaki rolünün tartışmalı olduğunu, ekzojen nitrik oksidin, oksijen ile reaksiyona girerek, dokunun canlılığına karşı ters etkileri olan peroksinitrit oluşumuna sebep olduğunu bildirmiştir'(72). 'İskeminin başlangıcında, cNOS yüksek konsantrasyonlarda NO üretilmesini sağlayarak, öncüsü olan L-arjinin'in bölgesel olarak tükenmesine sebep olur'(74). 'Bunun ardından düşük L-arginine konsantrasyonunun düşmesi nedeniyle, cNOS, nitrik oksid yerine süperoksid radikali oluşturmaktadır'(74). Kuo ve arkadaşlarının yapmış oldukları çalışmada '12 saatlik reperfüzyondan sonra flep iskemi-reperfüzyon hasarlanmasına bağlı olarak indüklenen endotel hücre hasarında, lokal veya bölgesel olarak iNOS ve endotelin-1 ekspresyonu ve total endojen plazma nitrik oksid seviyelerinin artması flep yaşamını bozmuştur'(72). 'Bu gözlemlere göre iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonrası endojen iNOS tarafından nitrik oksid üretilmesinin flep yaşamı üzerine zararlı etkileri olduğu anlaşılmıştır'(72). Bizim yapmış olduğumuz bu çalışmada selenyum takviyesi yapılan (grup 2) ve yapılmayan (grup 1) iki grup arasında NO seviyelerinde istatistiki olarak anlamlı bir farklılık saptanmamıştır. Ancak bizim çalışmamızda ölçülen nitrik oksid seviyeleri total nitrik oksid seviyeleri ölçülmüştür. Eğer cNOS ve iNOS seviyeleri immünohistokimyasal yöntem ile ölçülmüş olsaydı her iki grupta da iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonrası oluşan nitrik oksid seviyelerinin flep yaşamı üzerine olan etkilerinin faydalı yöne mi yoksa zararlı yöne mi yöneldiği hakkında fikir

edilmedi edebilirdik. Sadece nitrik oksid seviyeleri böyle bir sonuca ulaşmamız için yeterli değildir. Neovaskularizasyon, dokuların artan ihtiyaçlarını karşılamak üzere oluşan uyarılar sonucu yeni damar oluşumdur. 10 gün sonunda patoloji bölümünce yapılan doku değerlendirmesinde grup 2'deki preparatlarda, grup 1'deki preparatlara nazaran daha yoğun neovaskularizasyon gelişmiş olduğu değerlendirilmiştir.

Sonuç olarak seleyum takviyesi yapılarak bu ajanın çeşitli dokularda oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarına yönelik etkileri araştırılmıştır. Bu çalışmalar selenyumun etkilerini ve etki mekanizmalarını aydınlatmağa yönelik çalışmalar idi. Tezimizde bu çalışmaların bir kısmı aktararak etki mekanizmalarının anlatılması amaçlanmıştır. Kendi çalışmamızda elde edilen sonuçlar da selenyumun iskemi-reperfüzyon hasarlanmasındaki etkilerinin faydalı olduğu yönündedir.

İskemi-reperfüzyon hasarlanması, doku hasarlanmasına bunun sonucunda da nekroza neden olmaktadır. Çalışmamızda kaldırılan fleplerin canlı ve cansız alanlarının hesaplanması için Auto CAD 2009(102) programı kullanılmıştır. Bu çalışmada canlı alanın, cansız alana oranı, grup 2'de, grup 1'e nazaran istatistiki olarak anlamlı biçimde daha fazla idi. Bu netice, iskemi reperfüzyon hasarında selenyumun etkinliğini araştırdığımız bu deney modelinde selenyumun flep canlılığının korunmasında selenyumun etkin olduğunu ortaya koymaktadır.

Bizim yapmış olduğumuz çalışmanın bulguları ışığında MDA ve fleplerdeki canlı kalmış alanlar karşılaştırıldığında da iki grup arasında selenyumun etkinliğini gösteren istatistiki olarak anlamlı bulgular saptanmış olup, GSH ve NO parametreleri açısından da herhangi bir istatistiki anlamlılığı olan sonuç çıkmamıştır. Diğer taraftan nötrofil infiltrasyonunun kontrol grubunda, neovaskularizasyonun ise selenyum verilen iskemi-reperfüzyon grubunda daha şiddetli olduğunu bize düşündürmüştür.

Selenyumun, transvers rektus abdominis kas-deri fleplerinde oluşturulan iskemi-reperfüzyon hasarına karşı oluşturduğu bu koruyucu etkilerin, çeşitli selenoproteinler, glutatyon peroksidaz ailesinin izozimleri ve tiyoredoksin/tiyoredoksin redüktaz sisteminin etkilerine bağlı olduğunu düşünmekteyiz.

6.SONUÇ

İskemi reperfüzyon hasarı başta replantasyonlarda ve serbest flep transferlerinde halen karşımıza çıkabilen ve rutin klinik kullanıma girmiş bir tedavisi olmayan klinik bir durumdur. İskemi-reperfüzyon hasarına uğramış bir dokudaki hasarlanmanın ciddiyetine bağlı olarak, ilgili dokunun parsiyel kaybından, tam kaybına kadar değişen dramatik sonuçlarla karşılaşılabilir. Daha yüksek metabolik ihtiyaçları nedeniyle kas içeriği yoğun olan dokularda, sadece cilt içeriği olan dokulara nazaran iskemi-reperfüzyon hasarı, iskeminin başlamasından itibaren daha erken dönemde görülebilmektedir. Bu sebeple bizim çalışmamızda da bir kas-deri flebi olan rektus abdominis flebi seçilerek iskemi – reperfüzyon hasarına uğratılmıştır.

İskemi-reperfüzyon hasarında birçok mekanizma etkili olmaktadır. Glutasyon peroksidaz izoenzimleri, tiyoredoksin redüktaz enzimi, Selenoprotein P ve diğer selenoproteinler selenyum içermektedir ve çeşitli peroksidlerin indirgenmesi ile iskemi-reperfüzyon hasarına karşı etkilerini göstermektedirler.

İskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış rektus abdominis kas-deri fleblerinde selenyumun etkinliğini araştırdığımız bu çalışmanın sonucunda aşağıdaki bulgular elde edilmiştir:

1) İskemi-reperfüzyon hasarı sonrası, Hücre membranının yapısında da bulunan lipid hasarlanmasının kantitatif göstergesi olarak malonildialdehid seviyeleri ölçülmüştür. Bu ölçümlerin sonucunda grup 2’de grup 1’e nazaran malonildialdehid seviyeleri istatistiki olarak anlamlı miktarda düşük çıkmıştır. Yapmış olduğumuz çalışmada da grup 1 ve grup 2’deki nitrik oksid seviyeleri ölçülmüş ve iki grup arasında istatistiki olarak anlamlı bir fark

saptanmamıştır. NO oluşumunu sağlayan enzim olan nitrik oksid sentazın (NOS) iki izoformu mevcuttur. cNOS, iskemi reperfüzyon hasarına karşı koruyucu olan nitrik oksid oluşumuna sebep olurken, iNOS iskemi-reperfüzyon hasarından sorumlu olan nitrik oksidin oluşumundan sorumludur. Ancak bizim çalışmamızda ölçülen nitrik oksid seviyeleri total nitrik oksid seviyeleridir. Eğer cNOS ve iNOS seviyeleri immünohistokimyasal yöntem ile ölçülmüş olsaydı her iki grupta da iskemi-reperfüzyon hasarlanması sonrası oluşan nitrik oksid seviyelerinin flep yaşamı üzerine olan etkilerinin faydalı yöne mi yoksa zararlı yöne mi yöneldiği hakkında fikir edile edebilirdik. Sadece nitrik oksid seviyeleri böyle bir sonuca ulaşmamız için yeterli değildir.

2) NOS tarafından oluşturulan nitrik oksidin, iNOS tarafından oluşturulan nitrik okside oranı bilinmemektedir.

3) Bizim çalışmamızda redükte glutatyon miktarı ölçülmüş ve grup 1 ve grup 2 arasında istatistiki olarak bir anlamlılık saptanmamıştır. İskemi-reperfüzyon hasarında H₂O₂'nin ortamdan uzaklaştırılabilmesi için glutatyon sürekli yükseltgenip indirgenmektedir. Bu glutatyonun bir son ürün olmadığını göstermektedir. Bu sebeple redükte veya okside glutatyon seviyeleri değerli olmamalıdır. Bizim çalışmamızda, redükte GSH miktarında gruplar arasında istatistiki bir fark saptanmamıştır.

4) İskemi-reperfüzyon hasarlanması, iskemi-reperfüzyon hasarına uğramış dokunun tam veya kısmi kaybına neden olmaktadır. Bu çalışmada canlı alanın cansız alana oranı, grup 2'de, grup 1'e nazaran istatistiki olarak anlamlı biçimde daha fazla idi. Bu bulgu, selenyumun iskemi reperfüzyon hasarında etkisini araştırdığımız bu deney modelinde, iskemi-reperfüzyon hasarının flep yaşamını kısıtlayıcı etkisine karşı selenyumun etkin olduğunu kanıtlamaktadır.

5) Nötrofil infiltrasyonu, iskemi-reperfüzyon hasarını artıran ve ivme kazandıran bir sonuç doğurur. 24 saat sonunda patoloji bölümünce yapılan doku değerlendirmelerinde grup 1'deki preparatlarda, grup 2'deki preparatlara nazaran daha yoğun nötrofil infiltrasyonu olduğu yönünde bulgulara rastlanmıştır.

6) Neovaskularizasyon dokuların artan ihtiyaçlarını karşılamak üzere, oluşan uyarılar sonucu yeni damar oluşumdur. 10 gün sonunda patoloji bölümünce yapılan doku

değerlendirmesinde grup 2'deki preparatlarda grup 1'deki preparatlara nazaran daha yoğun neovaskularizasyon gelişmiş olduğu sonucuna varılmıştır.

Bu bulgular ışığında, selenyumun, kas-deri fleplerinde oluşabilecek iskemi-reperfüzyon hasarının etkisini azaltmada etkin olduğu anlaşılmaktadır. Bu etkisini, iskemi-reperfüzyon hasarına uğratılmış dokuya, daha az nötrofil göçüne sebep olması ile, daha az lipid/fosfolipid yıkımına yol açması ile, daha yoğun neovaskularizasyona yol açması ile göstermektedir. Canlı dokuların, nekrotik olanlara nazaran daha yüksek oranda olması da selenyumun gözle görülür kanıtı olarak değerlendirilmektedir.

Kolay ulaşılabilen, kolay uygulanabilen, ucuz ve antioksidan etkinliği de kanıtlanmış bir ajan olan selenyumun klinikte kullanıma girmesi hususunda klinik olarak çalışmalarımız devam etmektedir.

7.ÖZET

TENEKECI, GÖKTEKİN.: İskemi-reperfüzyon hasarında selenyumun kas-deri flepleri üzerindeki etkisi: Turgut Özal Tıp Merkezi, İnönü Üniversitesi, Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı, Tıpta Uzmanlık Tezi, Malatya, 2011.

Bu çalışmanın amacı, iskemi reperfüzyon hasarı oluşturulan kas-deri fleplerinde antioksidan bir ajan olan selenyumun etkinliğinin araştırılmasıdır. Bu çalışmada kas-deri fleplerinden rektus-abdominis kas deri flebi seçilerek bu flebin serbest aktarımını ifade eden bir deney modeli uygulanmıştır. Çalışmamızda 24 adet rat iki eşit gruba ayrılmış ve grup 1 (n=12) sadece iskemi-reperfüzyon hasarına uğratıldı, grup 2'ye (n=12) de iskemi uygulanmadan 2 saat önce 0.625 mg/kg selenyum intraperitoneal olarak verildi, ardından iskemi-reperfüzyon hasarına uğratıldı ve postop 10 gün boyunca da aynı dozdan selenyum tedavisine devam edilmiştir. Her iki gruptaki ratların yarısı 24. saatin sonunda kurban edildi. Biyokimyasal olarak, 24 saat sonra her iki grupta malonildialdehid, nitrik oksid ve glutatyon seviyeleri değerlendirildi, patolojik inceleme olarak 24 saat sonunda nötrofil infiltrasyonunun şiddeti ve 10. gün sonunda neovaskularizasyon yoğunluğu patolojik olarak değerlendirildi. Ayrıca her iki grupta 10. gün sonunda canlı alan oranları hesaplandı. Malonildialdehid seviyeleri grup 1'de, grup 2'ye nazaran istatistiki olarak anlamlı derecede daha yüksek ($p<0,05$) olarak bulunurken, nitrik oksid ve glutatyon seviyeleri arasında her iki grup arasında istatistiki olarak herhangi bir anlamlı fark saptanmamıştır. Nötrofil infiltrasyonu grup 1'de, grup 2'ye nazaran patologlar tarafından daha şiddetli olarak değerlendirilirken, neovaskularizasyon grup 2'de, grup 1'e nazaran daha yoğun olarak

değerlendirilmiştir. Ayrıca yapılan canlı alan hesaplaması sonuçlarına göre grup 2’de grup 1’e nazaran canlı alan oranının istatistiki olarak daha yüksek ($p>0,05$) olduğu saptandı. Bu çalışma iskemi reperfüzyon hasarına karşı selenyum tedavisinin kas-deri fleplerinde etkin ve koruyucu olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Kas-deri flebi, selenyum, malonildialdehid, nitrik oksid, glutatyon, iskemi-reperfüzyon hasarı.

8.SUMMARY

TENEKECI GOKTEKIN.: Effect of selenium on ischemia-reperfusion injured skin-muscle flaps: Medical Specialization Thesis in the Department of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery, Turgut Ozal Medical Center, Inonu University, Malatya, 2011.

The aim of this study is to investigate the effectiveness of selenium, antioxidant agent, on ischemia-reperfusion injured skin-muscle flaps. In this study, an experimental model which mimicked the free tissue transfer was applied by using rectus abdominis skin-muscle flap. 12 rats were divided equally into two groups: group 1(n=6) was exposed to ischemia-reperfusion injury; in group 2(n=6), 0.625 mg/kg selenium was injected through intraperitoneal route 2 hours before the induction of ischemia, thereafter the flaps were exposed to ischemia-reperfusion injury and selenium treatment was continued in the same way for 10 days more. At the end of the 24th hour malonyldialdehyde, nitric oxide and glutathione levels were measured biochemically while the extent of neutrophil infiltration was assessed at the end of 24 hours and the extent of neovascularization was evaluated at the end of the 10th day, by a patholog who was blinded to the samples. Also, at the end of the 10th day, percentage areas of viable tissues of each flap were calculated. Malonyldialdehyde levels increased significantly(p<0,05) in group 1 when compared to group 2 while, no statistical difference was found for nitric oxide and glutathione levels between group 1 and 2. Neutrophil infiltration was assessed as more intense in group 1 when compared to group 2 while neovascularization was found more abundant in group 2.

Flap survival in group 2 was higher when compared to group 1($p>0,05$). This study shows that selenium treatment is effective for ischemia-reperfusion injury in skin-muscle flaps.

Key Words: Skin-muscle flap, selenium, malonyldialdehyde, nitric oxide, glutathione, ischemia-reperfusion injury.

9. KAYNAKLAR

1. Zapletal C, Heyne S, Breikreutz R, Gebhard MM, Golling M. The influence of selenium substitution on microcirculation and glutathione metabolism after warm liver ischemia/reperfusion in a rat model. *Microvascular Research* 2008; 76:104-109.
2. Yousuf S, Atif F, Ahmad M, Hoda MN, Khan MB, Ishrat T, Islam F. Selenium plays a modulatory role against cerebral ischemia-induced neuronal damage in rat hippocampus. *Brain Research* 2007; 1147: 218-225.
3. Achauer BM, Eriksson E, Guyuron B, Coleman III JJ, Russell RC, Vander Kolk CA. *Plastic Surgery, Indications, Operations & Outcomes. Volume 1*; 2000: Mosby.
4. Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive Surgery, Principles, Anatomy & Technique. Volume 1*; 1997: Churchill Livingstone.
5. Mathes Stephen J. *Plastic Surgery, General Principles. Volume 1*; 2006: Saunders Elsevier.
6. Mathes SJ, Nahai F. *Reconstructive Surgery, Principles, Anatomy & Technique. Volume 2*; 1997: Churchill Livingstone.
7. Bayramiçli M. *Deneysel Mikrocerrahi*. 2005: İstanbul, Argos İletişim Hizmetleri Reklamcılık ve Ticaret A.Ş.
8. Drever JM. The epigastric island flap. *Plast Reconstr Surg* 1977; 59: 343-6.
9. Pennington DG, Pelly AD. The rectus abdominis myocutaneous free flap. *Br J Plast Surg* 1980; 33: 277-82.
10. Taylor GI, Corlett RJ, Boyd JB. The versatile deep inferior epigastric (inferior rectus abdominis) flap. *Br J Plast Surg* 1984; 37: 330-50.
11. Boyd JB, Taylor GI, Corlett R. The vascular territories of the superior epigastric and the deep inferior epigastric systems. *Plast Reconstr Surg* 1984; 73: 1-16.
12. Zhang F, Lineaweaver WC, Kao S. Microvascular transfer of the rectus abdominis muscle and myocutaneous flap in rats. *Microsurgery* 1993; 14: 420-3.
13. Dunn RM, Huff W, Mancoll J. The rat rectus abdominis myocutaneous flap: a true myocutaneous flap model. *Ann Plast Surg* 1993; 31: 352-7.

14. Heuvel MGW, Buurman WA, Bast A, Hulst RRWJ. Review: ischemia-reperfusion injury in flap surgery. *J Plast Reconstr & Aesthetic Surg* 2009; 62: 721-6.
15. Devlin Thomas M. *Textbook of Biochemistry with Clinical Correlations*. 2002: Wiley-Liss.
16. Cetin C, Kose AA, Aral E, et al. Protective effect of fucoidin (a neutrophil rolling inhibitor) on ischemia reperfusion injury: experimental study in rat epigastric island flaps. *Ann Plast Surg* 2001; 47: 540-6.
17. Im MJ, Manson PN, Bulkley GB, et al: Effects of superoxide dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann Surg* 1985; 201:357-9.
18. Manson PN, Anthenelli RM, Im MJ, et al. The role of oxygen-free radicals in ischemic tissue injury in island skin flaps. *Ann Surg* 1983; 198: 87-90.
19. Manson PN, et al. Improved survival in free skin flap transfers in rats. *Surgery* 1986; 99: 211-5.
20. Rand-Luby L, Pommier RF, Williams ST, et al. Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide. *Ann Surg* 1996; 224: 583-9. Discussion 589-90.
21. Kuo YR, Wang FS, Jeng SF, et al. Nitrosoglutathione promotes flap survival via suppression of reperfusion injury-induced superoxide and inducible nitric oxide synthase induction. *J Trauma* 2004; 57: 1025-31.
22. Whitson BA, Nath DS, Johnson AC, et al. Risk factors for primary graft dysfunction after lung transplantation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2006; 131: 73-80.
23. Kupiec-Weglinski JW, Busuttil RW. Ischemia and reperfusion injury in liver transplantation. *Transplant Proc* 2005; 37: 1653-6.
24. Burns AT, Davies DR, McLaren AJ, et al. Apoptosis in ischemia/ reperfusion injury of human renal allografts. *Transplantation* 1998; 66: 872-6.
25. Siemionow M, Arslan E. Ischemia/reperfusion injury: a review in relation to free tissue transfers. *Microsurgery* 2004; 24: 468-75.
26. Yoshida WB, Campos EB. Ischemia and reperfusion in skin flaps: effects of mannitol and vitamin C in reducing necrosis area in a rat experimental model. *Acta Cir Bras* 2005; 20: 358-63.

27. Francel TJ, Vander Kolk CA, Yaremchuk MJ et al. Locally applied hypothermia and microvascular muscle flap. *Ann Plast Surg* 1992; 28: 246-251.
28. Nahabedian MY, Momen B, Manson PN. Factors associated with anastomotic failure after microvascular reconstruction of the breast. *Plast Reconstr Surg* 2004; 114: 74-82.
29. Ames A III et al. Cerebral ischemia: II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52: 437-53, 1968.
30. Allen D, Chen L, Seaber A, Urbaniak J. Pathophysiology and related studies of the no reflow phenomenon in skeletal muscle. *Clin Orthop* 1995; 314: 122.
31. Ashoori F, Suzuki S, Zhou J, et al. Possible contributions of mastocytosis, apoptosis, and hydrolysis in pathophysiology of randomized skin flaps in humans and guinea pigs. *Plast Reconstr Surg* 1996; 98: 491.
32. Schmid-Schonbein GW. Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Fed Proc* 1987; 46: 2397-401.
33. Okada Y, Copeland BR, Fitridge R, Koziol JA, Zoppo DGJ. Fibrin contributes to microvascular obstructions and parenchymal changes during early focal cerebral ischemia and reperfusion. *Stroke* 1994; 25: 1847-54.
34. Gute DC, Ishida T, et al. Inflammatory responses to ischemia and reperfusion in skeletal muscle. *Moll Cell Bio* 1998; 179: 169-187.
35. Suval WD, Hobson RW 2nd, et al. Assessment of ischemia reperfusion injury in skeletal muscle by macromolecular clearance. *J SurgRes* 1987; 42(5): 550-9.
36. May JW Jr, Chait LA, et al. The no-reflow phenomenon in experimental free flaps. *Plast Reconstr Surg* 1978; 61: 256-67.
37. Zdeblick TA, Shaffer JW, Field GA. An ischemia-induced model of revascularization failure of replanted limbs. *J Hand Surg Am.* 1985; 10: 125-131.
38. Feng LJ, Berger BE, et al. Vasoactive prostaglandins in the impending no-reflow state: Evidence for a primary disturbance in microvascular tone. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81: 755-67.
39. Ozmen S, Ayhan S, Demir Y, et al. Impact of gradual blood flow increase on ischaemia-reperfusion injury in the rat cremaster microcirculation model. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 2008; 61: 939-48.

40. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Venous ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93(2): 366-74.
41. Hjortdal VE, Sinclair T, Kerrigan CL, Solymoss S. Arterial ischemia in skin flaps: microcirculatory intravascular thrombosis. *Plast Reconstr Surg* 1994; 93(2): 375-85.
42. Gürlek A, Schusterman MA, Evans GRD, Gherardini G. Blood flow and microcirculatory changes in an ischemia-reperfusion injury model: experimental study in the rabbit. *J Reconstr Microsurg* 1997; 13(5):345-9.
43. Gürlek A, Schusterman MA, Evans GRD, et al. Venous flap ischemia: microcirculatory changes in experimental flaps in a rabbit model. *J Reconstr Microsurg* 1998; 14(2): 121-6.
44. Roberts AP, Cohen JI, Cook TA. The rat ventral island flap: a comparison of the effects of reduction in arterial inflow and venous outflow. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 610-615.
45. Coban YK, Kurutas EB, Ciralik H. Ischemia-reperfusion injury of adipofascial tissue: an experimental study evaluating early histologic and biochemical alterations in rats. *Mediators Inflamm* 2005; 2005(5): 304-8.
46. Stotland MA, Kerrigan CL. E- and L-selectin adhesion molecules in musculocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99(7): 2010-20.
47. Chew BP, Park JS. Carotenoid action on the immune response. *J Nutr* 2004;134:257S-61S.
48. De Celle T, Heeringa P, Strzelecka AE, et al. Sustained protective effects of 7-mono-hydroxyethylrutoside in an in vivo model of cardiac ischemia-reperfusion. *Eur J Pharmacol* 2004; 494: 205-12.
49. Zaccaria A, Weinzwieg N, et al. Vitamin C reduces ischemiareperfusion injury in rat epigastric island skin flap. *Ann Plast Surg* 1994; 33: 620-623.
50. Tadolini B, Franconi F. Carvedilol inhibition of lipid peroxidation. A new antioxidative mechanism. *Free Radic. Res.* 1998; 29, 377-387.
51. Im MJ, Hoopes JE, Yoshimura Y, et al. Xanthine:acceptor oxidoreductase activities in ischemic rat skin flaps. *J Surg Res* 1989; 46: 230-4.

52. Angel MF, Im MJ, Chung HK, et al. Effects of combined cold and hyperbaric oxygen storage on free flap survival. *Microsurgery* 1994;15: 648-51.
53. Angel MF, Ramasastry SS, Swartz WM, et al. The critical relationship between free radicals and degrees of ischemia: evidence for tissue intolerance of marginal perfusion. *Plast Reconstr Surg* 1988; 81(2): 233-9.
54. Shah AM, Channon KM. Free radicals and redox signalling in cardiovascular disease. *Heart* 2004; 90(5): 486-7.
55. Cetinkale O, Bilgic L, Bolayirli M, et al. Involvement of neutrophils in ischemia-reperfusion injury of inguinal island skin flaps in rats. *Plast Reconstr Surg* 1998; 102(1): 153-60.
56. de Vries B, Kohl J, Leclercq WK, et al. Complement factor C5a mediates renal ischemia-reperfusion injury independent from neutrophils. *J Immunol* 2003;170(7): 3883-9.
57. Granger DN, Kvietys PR, Perry MA. Leukocyte – endothelial cell adhesion induced by ischemia and reperfusion. *Can J Physiol Pharmacol* 1993; 71(1): 67-75.
58. Kirschner RE, Fyfe BS, Hoffman LA. Et al. Ischemia-reperfusion infury in myocutaneous flaps: Role of leukocytes and leukotrienes. *Plast Reconstr Surg* 1997; 99(6): 1485-1493; discussion 1494-5.
59. Siemionow M, Demirkan F, Rockwell WB, Lister GD: Anti- ICAM-1 antibodies protect allografts against microvascular and parenchymal cell damage. *J Hand Surg* 1997; 22(5): 922-30.
60. Kim EK, Hong JP. The effect of recombinant human erythropoietin on ischemia-reperfusion injury: an experimental study in a rat TRAM flap model. *Plast Reconstr Surg* 2007; 120: 1774-81.
61. PayneD, KubesP. Nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion-induced intestinal mucosal permeability. *Am J Physiol* 1993; 265(1 pt 1): G189-195.
62. Linas S, Whittenburg D, Repine JE. Nitric oxide prevents neutrophil-mediated acute renal failure. *Am J Physiol* 1997; 272(1 pt 2): F48-54.
63. Siegfried MR, Erhardt J, Rider T, et al. Cardioprotection and attenuation of endothelial dysfunction by organic nitric oxide donors in myocardial ischemia-reperfusion. *J Pharmacol Exp Ther* 1992; 260(2): 668-675.

64. Weyrich AS, Ma XL, Lefer AM. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* 1992; 86(1): 279-288.
65. Morikawa E, Huang Z, Moskowitz MA. L-arginine decreases infarct size caused by middle cerebral arterial occlusion in SHR. *Am J Physiol* 1992; 263(5 pt 2): H1632-5.
66. Gauthier TW, Davenpeck KL, Lefer AM. Nitric oxide attenuates leucocyte-endothelial interaction via P-selectin in splanchnic ischemia-reperfusion. *Am J Physiol* 1994; 267(4 pt 1): G562-8.
67. Spiecker M, Darius H, Kaboth K, et al. Differential regulation of endothelial cell adhesion molecule expression by nitric oxide donors and antioxidants. *J Leukoc Biol* 1998; 63(6): 732-9.
68. Lindemann S, Sharafi M, Spiecker M, et al. NO reduces PMN adhesion to human vascular endothelial cells due to downregulation of ICAM-1 mRNA and surface expression. *Thromb Res* 2000; 97(3): 113-23.
69. Roth E. The impact of L-arginine-nitric oxide metabolism on ischemia/reperfusion injury. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care* 1998;1(1):97-9.
70. Um SC, Suzuki S, Toyokuni S, et al. Involvement of nitric oxide in survival of random pattern skin flap. *Plast Reconstr Surg* 1998; 101(3): 785-92.
71. Meldrum DG, Stephenson LL, Zamboni WA. Effects of L-NAME and L-arginine on ischemia-reperfusion injury in rat skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg* 1999; 103(3): 935-40.
72. Kuo YR, Wang FS, Jeng SF, et al. Nitrosoglutathione improves blood perfusion and flap survival by suppressing iNOS but protecting eNOS expression in the flap vessels after ischemia/ reperfusion injury. *Surgery* 2004; 135(4): 437-46.
73. Çakatay U, Telci A, Kayalı R, Tekeli F, Akçay T, Sivas A. Relation of aging with oxidative protein damage parameters in rat skeletal muscle. *Clin Biochem* 2003; 36(1): 51-5.
74. Nanobashvili J, Neumayer C, Fuegl A, et al. Combined L-arginine and antioxidative vitamin treatment mollifies ischemia-reperfusion injury of skeletal muscle. *J Vasc Surg* 2004; 39(4): 868-77.
75. Lenton KJ, Therriault H, Fulop T, Payette H, Wagner J.R. Glutathione and ascorbate are negatively correlated with oxidative DNA damage in human lymphocytes. *Carcinogenesis* 1999; 20(4): 607-13.

76. Wolff K-D, Stiller D. Ischemia tolerance of free-muscle flaps. An NMR-spectroscopic study in the rat. *Plast Reconstr Surg* 1993; 91(3):485-91.
77. Donski PK, Franklin JD, et al. The effects of cooling on experimental free flap survival. *Br J Plast Surg* 1980; 33(3): 353-60.
78. Mates J.M, Gomez C.P, Nunez de Castro I. Antioxidant enzymes and human diseases. *Clin Biochem* 1999; 32(8): 595-603.
79. Scarabelli TM, Gottlieb RA. Functional and clinical repercussions of myocyte apoptosis in the multifaceted damage by ischemia/reperfusion injury: old and new concepts after 10 years of contributions. *Cell Death Differ* 2004;11(Suppl. 2): S144-52.
80. Jaeschke H. Reperfusion injury after warm ischemia or cold storage of the liver: role of apoptotic cell death. *Transplant Proc* 2002; 34(7): 2656-8.
81. Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, et al. *Hepatology* 2001; 33: 397-405.
82. Gladyshev VN, Hatfield DL. Selenocysteine-containing proteins in mammals. *J Biomed Sci* 1999; 6(3): 151–60.
83. Steinbrenner H, Sies H. Protection against reactive oxygen species by selenoproteins. *Biochimica et Biophysica Acta* 2009; 1790(11): 1478-85.
84. Papp LV, Lu J, Holmgren A, Khanna KK. From selenium to selenoproteins: synthesis, identity, and their role in human health. *Antioxid Redox Signal* 2007; 9 (7): 775–806.
85. Maiorino M, Aumann KD, Brigelius-Flohé R, et al. Probing the presumed catalytic triad of selenium-containing peroxidases by mutational analysis of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx). *Biol Chem Hoppe-Seyler* 1995; 376(11): 651–660.
86. Tapiero H, Townsend DM, Tew KD. The antioxidant role of selenium and selenocompounds. *Biomedicine Pharmacotherapy* 2003; 57(3-4): 134-44.
87. Yagi K, Komura S, Kojima H, et al. Expression of human phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase gene for protection of host cells from lipid hydroperoxidemediated injury. *Biochem Biophys Res Commun* 1996; 219(2); 486–491.
88. Björnstedt M, Hamberg M, Kumar S, Xue J, Holmgren A. Human thioredoxin reductase directly reduces lipid hydroperoxides by NADPH and selenocystine strongly stimulates the reaction via catalytically generated selenols. *J Biol Chem* 1995; 270 (20): 11761–4.

- 89.** Rubartelli A, Bajetto A, Allavena G, Wollman E, Sitia R. Secretion of thioredoxin by normal and neoplastic cells through a leaderless secretory pathway. *J Biol Chem* 1992; 267 (34): 24161–4.
- 90.** Ottaviano FG, Handy DE, Loscalzo J. Redox regulation in the extracellular environment. *Circ J* 2008; 72(1): 1–16.
- 91.** Björnstedt M, Xue J, Huang W, Akesson B, Holmgren A. The thioredoxin and glutaredoxin systems are efficient electron donors to human plasma glutathione peroxidase. *J Biol Chem* 1994; 269 (47): 29382–4.
- 92.** Speckmann B, Walter PL, Alili L, et al. Selenoprotein P expression is controlled through interaction of the coactivator PGC-1alpha with FoxO1a and hepatocyte nuclear factor 4alpha transcription factors. *Hepatology* 2008; 48 (6): 1998–2006.
- 93.** Burk RF, Hill KE, Awad JA, Morrow JD, Kato T, Cockell KA, et al. Pathogenesis of diquat-induced liver necrosis in selenium-deficient rats: assessment of the roles of lipid peroxidation and selenoprotein P. *Hepatology* 1995; 21(2): 561–9.
- 94.** Motsenbocker MA, Tappel AL. A selenocysteine-containing selenium-transport protein in rat plasma. *Biochim Biophys Acta* 1982; 719 (1): 147–53.
- 95.** Saito Y, Hayashi T, Tanaka A, et al. Selenoprotein P in human plasma as an extracellular phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase. Isolation and enzymatic characterization of human selenoprotein P. *J Biol Chem* 1999; 274 (5): 2866–71.
- 96.** Takebe G, Yarimizu J, Saito Y, et al. A comparative study on the hydroperoxide and thiol specificity of the glutathione peroxidase family and selenoprotein P. *J Biol Chem* 2002; 277 (43): 41254–8.
- 97.** Arteel GE, Mostert V, Oubrahim H, Briviba K, Abel J, Sies H. Protection by selenoprotein P in human plasma against peroxynitrite-mediated oxidation and nitration. *Biol Chem* 1998; 379 (8-9): 1201–5.
- 98.** Traulsen H, Steinbrenner H, Buchczyk DP, Klotz LO, Sies H. Selenoprotein P protects low-density lipoprotein against oxidation. *Free Radic Res* 2004; 38 (2): 123–8.
- 99.** Saito Y, Sato N, Hirashima M, Takebe G, Nagasawa S, Takahashi K. Domain structure of bi-functional selenoprotein P. *Biochem J* 2004; 381 (Pt 3): 841–6.

- 100.**Steinbrenner H, Alili L, Bilgic E, Sies H, Brenneisen P. Involvement of selenoprotein P in protection of human astrocytes from oxidative damage. *Free Radic Biol Med* 2006; 40 (9): 1513–23.
- 101.**Jeong D, Kim DS, Chung YW, Lee BJ, Kim IY. SelenoproteinW is a glutathione dependent antioxidant in vivo. *FEBS Lett.* 2002; 517 (1-3): 225–228.
- 102.**Auto CAD 2009, Autodesk.
- 103.**Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem.* 1979; 95(2): 351-358.
- 104.**Ellman GL. Tissue sulphhydryl groups. *Arch Biochem Biophys.* 1959; 82: 70-77.
- 105.**Jungersten L, Edlund A, Petersson AS, Wennmalm A. Plasma nitrate as an index of nitric oxide formation in man: analyses of kinetics and confounding factors. *Clin Physiol* 1996; 16(4): 369–79.
- 106.**Zeballos GA, Bernstein RD, Thompson CI, et al. Pharmacodynamics of plasma nitrate/nitrite as an indication of nitric oxide formation in conscious dogs. *Circulation* 1995; 91(12): 2982–8.
- 107.**Ozbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, Davarci M, Ozugurlu F. Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele. *Eur Urol.* 2000; 37(2): 172-5.
- 108.**Özbal S, Erbil G, Koçdor H, et al. The effects of selenium against cerebral-ischemia-reperfusion injury in rats. *Neuroscience Letters* 2008; 438 (3):265-9.
- 109.**Tanguy S, Morel S, Berthonneche C, et al. Preischemic selenium status as a major determinant of myocardial infarct size in vivo in rats. *Antioxid Redox Signal* 2004; 6 (4): 792-6.
- 110.**Liu D, Liu S, Huang Y, et al. Effect of selenium on human myocardial glutathione peroxidase gene expression. *Chinese Medical Journal* 2000; 113(9): 771-775.
- 111.**Öztürk C, Avlan D, Cinel İ, et al. Selenium pretreatment prevents bacterial translocation in rat intestinal ischemia/reperfusion model. *Pharmacol Res.* 2002; 46(2): 171-5.