T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ PLASTİK, REKONSTRUKTİF VE ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇAN ALT EKSTREMİTE AKUT İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE CORM-3 MOLEKÜLÜNÜN ETKİLERİNİN GİNGKO BİLOBA, N-ASETİLSİSTEİN VE PENTOKSİFİLİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Harun KARADUMAN

Ankara, 2020

T.C.
ANKARA YILDIRIM BEYAZIT ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ PLASTİK, REKONSTRUKTİF VE ESTETİK
CERRAHİ ANABİLİM DALI

SIÇAN ALT EKSTREMİTE AKUT İSKEMİ REPERFÜZYON MODELİNDE CORM-3 MOLEKÜLÜNÜN ETKİLERİNİN GİNGKO BİLOBA, N-ASETİLSİSTEİN VE PENTOKSİFİLİN İLE KARŞILAŞTIRILMASI

TIPTA UZMANLIK TEZİ

Dr. Harun KARADUMAN

TEZ DANIŞMANI
Dr. Öğr. Üyesi Ensar Zafer BARIN

Bu araştırma; Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Birimi tarafından 7460 nolu proje ile desteklenmiştir.

ANKARA, 2020

ÖNSÖZ

Atatürk Üniversitesi' ndeki eğitim süresi boyunca bilgi ve deneyimlerini bana aktaran çok değerli hocalarım Prof. Dr. Önder TAN, Dr. Öğr. Üyesi Said ALĞAN, Dr. Öğr. Üyesi Hakan ÇİNAL, Dr. Öğr. Üyesi Abdülkerin OLĞUN ve Dr. Öğr. Üyesi Murat KARA' ya, Ankara Şehir Hastanesi' ndeki eğitim sürem boyunca katkıları olan Prof. Dr. Ramazan Erkin Ünlü, Prof. Dr. Mustafa Erol DEMİRSEREN, Doç. Dr. Yakup ÇİL, Opr. Dr. Murat İĞDE, Opr. Dr. Mehmet SÖNMEZ, Opr. Dr. Hasan Murat ERGANİ, Opr. Dr. Burak YAŞAR' a

Eğitim sürecinde birlikte çalışmaktan gurur duyduğum Dr. Akın İNALÖZ, Dr. Mehmet Akif ÇAKMAK, Dr. Kerem YILMAZ, Dr. İhtişam Zafer CENGİZ, Dr. Oğuz BOYRAZ, Dr. Ömer PARILDAR, Dr. Melih ÇAKAROĞLU, Dr. Muhammet Revaha KIRTILLI, Dr. Emrah PATAT başta olmak üzere Atatürk Üniversitesi ve Ankara Şehir Hastanesi Plastik, Rekonstruktif ve Estetik Cerrahi Kliniği ve Ameliyathanesi' nin asistan doktorları ve sağlık çalışanlarına

Desteğini her koşulda eksik etmeyen tez danışmanım Dr. Öğr. Üyesi Ensar Zafer BARIN' a, tez konusu hakkında fikir veren Dr. Esra GÜNDOĞDU' ya, tezin proje yapılmasında her zaman yardımcı olan Prof. Dr. Elif ÇADIRCI' ya, Gingko biloba bitkisi ve ekstresinin elde edilmesinde Biyolog Burçin ÇINGAY ve Dr. Öğr. Üyesi Esen SEZEN KARAOĞLAN' a, deneysel işlemler sırasında yardımlarını eksik etmeyen Prof. Dr. Yasin BAYIR, Paramedik Muhammed YILMAZ, Hemşir İsmail TUFAN ve Furkan İNCİ' ye, biyokimya, patoloji ve istatistik verilerinin elde edilmesinde Doç. Dr. Nurinnisa ÖZTÜRK, Doç. Dr. Serkan YILDIRIM, Dr. Öğr. Üyesi Betül Gündoğdu ve Dr. Öğr. Üyesi Sinan YILMAZ'a, tez metninin düzenlenmesinde yardımlarını eksik etmeyen Dr. Murat Enes Sağlam ve Yüksek Mühendis Aslı Sebatlı SAĞLAM' a

Hayatımın her döneminde emeği ve desteği ile yanımda olan sevgili annem, babam, abim ve kardeşlerime, asistanlık sürem boyunca sevgisini ve desteğini her zaman yanımda hissettiğim Dr. Berna ÖZBAY' a sonsuz sevgi, saygı ve teşekkürler…

Dr. Harun KARADUMAN

15 Eylül 2020

ÖZET

Sıçan alt ekstremite akut iskemi reperfüzyon modelinde CORM-3 molekülünün etkilerinin Gingko biloba, N- Asetilsistein ve Pentoksifilin ile karşılaştırılması

Amaç: İskemi, çeşitli nedenlerden dolayı dokulara ulaşan kan akımının azalması ya da sağlanamamasıdır. Akut ekstremite iskemisi, yüksek morbidite, mortalite ve maliyetler içeren bilinen en yaygın periferik vasküler acil durumlardan birisidir. Reperfüzyon ise iskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır. Ekstremitelerde oluşan akut iskemi-reperfüzyon hasarında, iskelet kasları özel bir öneme sahiptir. Bu çalışmada, alt ekstremite akut iskemi-reperfüzyon hasarı modelinde CORM-3 molekülünün ortaya çıkardığı etkiler; Ginkgo biloba Ekstresi, N-Asetilsistein ve Pentoksifilin ilaçlarının ortaya çıkardığı etkiler ile karşılaştırmaktır.

Yöntem: Çalışmada 56 adet Sprague- Dawley cinsi sıçan her bir grupta 8 sıçan olacak şekilde 7 farklı gruba ayrıldı. Grup 1 kontrol grubu olarak planlandı, Grup 2-3-4-5-6 ise iskemi-reperfüzyon grupları olarak planlanıp, başlangıçta turnike ile 4 saat iskemi yapıldı. Ekstremitenin en distalinden yani ayak parmaklarından başlanarak sarılan Esmarch bandaj trokanter majör hizasında sonlandırıldıktan sonra kilitli kablo bağı eşit bir şekilde sağ alt ekstremitede kilitlenip, istenilen iskemi modelinin oluşması sağlandı. Grup 1 ve 2 ye herhangi bir enjeksiyon yapılmadı; Grup 3-4-5-6'ya ise 4 saatin sonunda turnike açılmadan sırasıyla CORM-3, Gingko biloba, N- Asetilsistein ve Pentoksifilin intraperitoneal olarak enjekte edildi. Grup 7 ye ise CORM-3 molekülünün proflaktik etkisini de değerlendirmek amacıyla turnike ile iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturulmadan yaklaşık 1 saat önce, intraperitoneal ilaç enjeksiyonu yapılıp, yine turnike ile 4 saat iskemi yapıldı. Sonuçlar biyokimyasal, videoanjiyografik ve patolojik kritelere göre incelendi.

Bulgular: Biyokimyasal incelemelerde; Grup 2 yani I/R grubunda CK ve myoglobin değerlerinin ortalaması 22.621,00 ve 305,19 U/L ve her iki enzim ölçümü için de G7- G2 arasında ($p<0,001$) olmak üzere anlamlı derece fark vardı. LDH enzim değerleri ortalamasına bakıldığında tedavi ajanlarının kullanıldığı tüm gruplarda LDH değeri Grup 2' den daha düşüktü; fakat istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark yoktu.

Videoanjiografik incelemelerde; iskemi yapılmayan Grup 1 haricinde tüm gruplarda sağ/sol perfüzyon dağılımları açısından anlamlı düzeyde fark vardı. Sağ/sol ekstremite proksimali ve middle bölgesi sonuçları değerlendirildiğinde; G2 ile G3, G6 ve G7 arasında anlamlı fark vardı. Sağ/sol ekstremite distali değerlendirildiğinde ise; iskemi yapılmayan ekstremitede G2 ile G3,G6 ve G7 arasında anlamlı fark mevcut iken, iskemi yapılan ekstremitede G2 ile G3 ve G7 arasında anlamlı fark mevcuttu.

Patolojik incelemelerde ise tüm kriterlerde G7 ile G2 arasında anlamlı fark mevcuttu.

Sonuç: Ekstremitelerin iskemik koşullandırılmasıyla iskemi yapılan ekstremitenin orta ve küçük çaplı damar anjiyozomlarında, iskemi yapılmayan ekstremitenin ise büyük, orta ve küçük damar anjiyozomlarında perfüzyon artışı olur. CORM-3 molekülü hem proflaktik hem terapötik dozlarda büyük, orta ve küçük çaplı damar anjiyozomlarında perfüzyonu artırırken; pentoksifilin molekülü terapötik dozlarda büyük ve orta çaplı damar anjiyozomlarında perfüzyonu artırır.

Anahtar kelimeler : CORM-3, İskemi reperfüzyon hasarı, Gingko biloba, N-Asetilsistein (NAC), Pentoksifilin

ABSTRACT

Comparison of the effects of the CORM-3 molecule with Gingko biloba, N-Acetylcysteine and Pentoxifylline in a rat lower extremity acute ischemia-reperfusion model.

Objective: Ischemia is the decrease or failure of blood flow to tissues due to various reasons. Acute limb ischemia is one of the most common peripheral vascular emergencies known, with high morbidity, mortality, and costs. Reperfusion is the restoration of blood flow to ischemic tissue. In acute ischemia-reperfusion injury that occurs in the extremities, skeletal muscles have special importance. In this study, the effects of the CORM-3 molecule in the lower limb acute ischemia-reperfusion injury model were compared with the effects of Ginkgo biloba extract, N-acetylcysteine and Pentoxyphilline drugs.

Methods: In the study, 56 Sprague-Dawley rats were divided into 7 different groups with 8 rats in each group. Group 1 was planned as the control group, Group 2-3-4-5-6 was planned as ischemia-reperfusion groups and initially, ischemia was performed for 4 hours with a tourniquet. After the Esmarch bandage, which was wrapped starting from the most distal of the extremity, namely from the toes, was terminated at trochanter major level, the locked cable tie was evenly locked in the lower right extremity the desired ischemia pattern was achieved. No injections were given to Groups 1 and 2; Group 3-4-5-6 were intraperitoneally injected with CORM-3, Gingko biloba, N - acetylcysteine and Pentoxyphilline, respectively, without opening the tourniquet at the end of 4 hours. Intraperitoneal drug injection was applied to Group 7, approximately 1 hour before the ischemia-reperfusion injury in order to evaluate the prophylactic effect of the CORM-3 molecule and ischemia was performed with a tourniquet for 4 hours. The results were analyzed according to biochemical, videoangiographic and pathological criteries.

Results: In biochemical studies, there was a significant difference between the mean values of CK and myoglobin in Group 2, i.e. I/R, 22.621, 00 and 305.19 U/L, and G7 - G2 ($p<0.001$) for both enzyme measurements. When looking at the average of LDH enzyme values, LDH value was lower than Group 2 in all groups in which treatment

agents were used but there was no statistically significant difference between them. In videoangiographic examinations, there was a significant difference in the right/left perfusion distributions in all groups except Group 1, which did not have ischemia. When the right / left limb proximal and middle region results were evaluated, there was a significant difference between G2 and G3, G6 and G7. When the right / left limb distal was evaluated, there was a significant difference between G2 and G3, G6 and G7 in the extremities without ischemia, while there was a significant difference between G2 and G3 and G7 in the extremities without ischemia.

In pathological examinations, there was a significant difference between G7 and G2 in all criteria.

Conclusion: There is an increase in perfusion in medium and small diameter vascular angiosomes of the extremities that are ischemic by ischemic conditioning of the extremities, and in large, medium and small vascular angiosomes of the extremities that are not ischemic. While CORM-3 molecule increases perfusion in large, medium and small diameter vessel angiosomes at both prophylactic and therapeutic doses, the pentoxifylline molecule at therapeutic doses increases perfusion in large and medium vascular angiosomes.

Keywords: CORM-3, Ischemia-reperfusion injury, Gingko biloba, N- Asetilsistein (NAC), Pentoksifilin

İÇİNDEKİLER

Sayfa

ÖNSÖZ i
ÖZET ii
ABSTRACT iv
TABLOLAR DİZİNİ viii
ŞEKİLLER DİZİNİ ix
SİMGELER ve KISALTMALAR xi
1. GİRİŞ ve AMAÇ 1
2. GENEL BİLGİLER 5
2.1. I/R Hasarının Tarihçesi 5
2.2. I/R Hasarı ve Patofizyolojik Gelişim Mekanizması 6
2.2.1. Hücre Zedelenmesi ve Nekroz 6
2.2.2. İskemik ve Hipoksik Zedelenme 10
2.2.3. I/R Hasarı ve Gelişim Mekanizması 11
2.2.3.1. Lökosit-Endotel Reaksiyonları 13
2.2.3.2. Lökosit-Endotel Reaksiyonları 16
2.2.3.3. Nitrik Oksit (NO) 18
2.2.3.4. Kompleman sistemi, Mast Hücreleri ve İmmün Kompleksler 19
2.3. I/R Hasarı ve Güncel Literatür Çalışmaları 21
2.3.1. I/R Hasarı Tedavisinde Kullanılan Cerrahi Yöntemler 30
2.3.2. I/R Hasarı Tedavisinde Kullanılan Farmakolojik Yöntemler 34
2.3.2.1. Antitrombotik Ajanlar 35
2.3.2.2. Trombolitik Ajanlar 36
2.3.2.3. Serbest Radikal Kurtarıcıları, Vazodilatör ve Antiinflamatuar Ajanlar 36
2.3.2.4. Lökosit İnhibisyonu Yapan Antikorlar 38
2.3.2.5. I/R Hasarı Deney Modelinde Kullanılan Antioksidan, Antiinflamatuar ve Vazodilatör Etkili İlaçlar 38
2.3.2.5.1. Karbon Monoksit Releasing Molekül-3 (CORM-3) 38
2.3.2.5.2. Gingko biloba Ekstresi (GbE-761) 42
2.3.2.5.3. N- Asetilsistein (NAC) 43
2.3.2.5.4. Pentoksifilin 45

3. GEREÇ ve YÖNTEM 49
3.1. Power Analiz Çalışması 49
3.2. Deney Gruplarının İsimlendirilmesi 50
3.3. Deney Modelinde Kullanılan Farmakolojik Ajanlar 51
3.4. I/R Deney Modelinin Oluşturulması 53
3.5. Verilerin Elde Edilmesi 55
3.5.1. Biyokimyasal Verilerin Elde Edilmesi 55
3.5.2. ICG Kullanılarak SPY Cihazı ile Anjiyografik Ölçümlerin Yapılması 56
3.5.3. Patolojik Verilerin Elde Edilmesi 58
3.5.4. İstatistiksel Değerlendirme 59
4. BULGULAR 60
4.1. Vücut Ağırlıkları 60
4.2. Gastroknemius Kas Ağırlıkları 61
4.3. Biyokimyasal Bulgular 62
4.3.1. CK Enzim Aktivitesi 62
4.3.2. LDH Enzim Aktivitesi 63
4.3.3. Myoglobin Değerleri 64
4.4. SPY ile Elde Edilen Anjiyografik Bulgular 65
4.5. Patolojik Bulgular 74
5. TARTIŞMA 84
6. SONUÇ ve ÖNERİLER 94
KAYNAKLAR 95
EKLER 106

TABLOLAR DİZİNİ

Sayfa

Tablo 1. Akut ekstremite iskemisinin evreleri 21
Tablo 2. Gruplardaki hayvanların vücut ağırlığı tanımlayıcı istatistikleri 60
Tablo 3. Gruplardaki hayvanların gastroknemius kas ağırlığı tanımlayıcı istatistikleri 61
Tablo 4. Gruplardaki ortalama CK enzim değerleri (U/L cinsinden) 62
Tablo 5. Gruplardaki ortalama LDH enzim değerleri (U/L cinsinden) 63
Tablo 6. Gruplardaki ortalama Myoglobin değerleri (ng/ml cinsinden) 64
Tablo 7. Sağ proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 68
Tablo 8. Sol proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 69
Tablo 9. Sağ middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 70
Tablo 10. Sol middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 71
Tablo 11. Sağ distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 72
Tablo 12. Sol distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 73
Tablo 13. Gruplardaki hayvanlarda histopatolojik bulguların dağılımı 81

ŞEKİLLER DİZİNİ

Sayfa

Şekil 1. Stres ve zedeleyici uyaranlara karşı hücresel yanıtın evreleri 7

Şekil 2. Hücre zedelenmesinde başlıca hücresel ve biyokimyasal zedelenme yerleri 8

Şekil 3. Hücre içindeki ATP kaybının fonksiyonel ve morfolojik sonuçları 9

Şekil 4. Normal bir hücrenin geri dönüşlü ve geri dönüşsüz zedelenmede gösterdiği değişiklikler 11

Şekil 5. İskemi ve reperfüzyon sırasında meydana gelen olayların sırası 13

Şekil 6. Tahmini ödem ve hücresel infiltrasyonların kinetikleri 15

Şekil 7. Araşidonik asit metabolitlerinin oluşumu ve inflamasyondaki etkileri 16

Şekil 8. ROT' ların oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları 17

Şekil 9. İnflamasyonda NO kaynakları ve etkileri 18

Şekil 10. Kompleman Kaskadı 20

Şekil 11. Bir miyofibrilin gevşek ve kasılı durumları, aktin filamentinin miyozin filamentlerinin arasındaki boşluklara kayması ve Z disklerini birbirine doğru çekmesi 25

Şekil 12. Kas kontraksiyonu için enerji sağlayan önemli metabolik sistemler 27

Şekil 13. HO yolağı veya CORM tarafından üretilen CO' nun metabolizması 40

Şekil 14. CORM-3' ün kimyasal yapısı 41

Şekil 15. Gingko biloba yaprakları ve GbE-761' in önemli bileşenlerinin kimyasal yapısı 42

Şekil 16. N-asetilsisteinin kimyasal formülasyonu 44

Şekil 17. Pentoksifilin molekülünün kimyasal formülasyonu 46

Şekil 18. Deney için kullanılan anestezi ilaçları 51

Şekil 19a. CORM-3 molekülü 52

Şekil 19b. Gingko biloba ekstraktı 52

Şekil 19c. NAC molekülü 52

Şekil 19d. Pentoksifilin molekülü 52

Şekil 20. Esmarch bandaj işleminin uygulanması 53

Şekil 21. Kilitli kablo bağı ile iskemi modelinin oluşturulması 54

Şekil 22. İskemi yapılan sağ alt ekstremite iskemi modelinin kontrol edilmesi ve sol alt ekstremiteyle pulse oksimetre cihazı kullanılarak karşılaştırılması 54

Şekil 23. 4 saatlik iskemi süresi sonrası sağ alt ekstremitenin görünümü 55

Şekil 24. İskemi süresinin sonunda Grup 2-3-4-5 ve 6' ya ilaç enjeksiyonlarının yapılıp, kilitli kablo bağının açılması ve Grup-7 ye iskemiden 1 saat önce proflaktik CORM-3 enjeksiyonunun yapılması 55

Şekil 25. Biyokimyasal değerlendirmeler için kan örneği alınması 56

Şekil 26. ICG, SPY cihazı ve anjiyografik ölçümler için deney modelinin hazırlanması 57

Şekil 27a. Kontrol grubundaki bir sıçana ait olan SPY görüntüleri 57

Şekil 27b. Kontrol grubundaki bir sıçana ait olan yüzdelik cinsinden SPY görüntüleri 58

Şekil 28. Kontrol ve I/R gruplarından gastroknemius kas örneklerinin alınması 59

Şekil 29. Gruplardaki ortalama vücut ağırlığı dağılımları 60

Şekil 30. Gruplardaki ortalama gastroknemius kas ağırlığı dağılımları 61

Şekil 31. Gruplardaki ortalama CK enzim değerleri (U/L cinsinden) 62

Şekil 32. Gruplardaki ortalama LDH enzim değerleri (U/L cinsinden) 63

Şekil 33. Gruplardaki ortalama Myoglobin değerleri (ng/ml cinsinden) 64

Şekil 34a. Grup 1- Kontrol 65

Şekil 34b. Grup 2- I/R 65

Şekil 34c. Grup 3- I/R+CORM-3 66

Şekil 34d. Grup 4- I/R+ GbE 66

Şekil 34e. Grup 5- I/R+ NAC 66

Şekil 34f. Grup 6- I/R+ Pentoksifilin 67

Şekil 34g. Grup 7- CORM-3+ I/R 67

Şekil 35. Sağ proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 68

Şekil 36. Sol proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 69

Şekil 37. Sağ middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 70

Şekil 38. Sol middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 71

Şekil 39. Sağ distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 72

Şekil 40. Sol distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden) 73

Şekil 41. Gastroknemius kası, normal histolojik görünümü 74

Şekil 42. Grup 2-I/R, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 75

Şekil 43. Grup 2-I/R, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 75

Şekil 44. Grup 3- I/R+CORM3, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 76

Şekil 45. Grup 4- I/R+GbE, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 77

Şekil 46. Grup 5- I/R+NAC grup, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 78

Şekil 47. Grup 6- I/R+Pentoksifilin, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 79

Şekil 48. Grup 7- CORM3+I/R, gastroknemius kası histopatolojik görünümü 80

SİMGELER ve KISALTMALAR

PMNL : Polimorfonükleer Lökosit
I/R : İskemi-Reperfüzyon
CORM-3 : Karbonmonoksit Releasing Molekül-3
cGMP : Siklik Guanozin Monofosfat
K^+ : Potasyum
GbE : Gingko Biloba Ekstresi
NAC : N-Asetilsistein
cAMP : Siklik Adenozin Monofosfat
ATP : Adenozin Trifosfat
DNA : Deoksiribonükleik Asit
Na^+ : Sodyum
ER : Endoplazmik Retikulum
Ca^{+2} : Kalsiyum
ROT : Reaktif Oksijen Türleri
H_2O : Su
Cl^- : Klor
AA : Araşidonik Asit
5-HPETE : 5-Hidroperoksieikosatetraenoik Asit
5-HETE : 5- Hidroksieikosatetraenoik Asit
LTA_4 : Lökotrien A4
LTB_4 : Lökotrien B4
LTC_4 : Lökotrien C4
LXA_4 : Lipoksin A4
LXB_4 : Lipoksin B4
NADPH : Nikotinamid Adenin Dinükleotid Fosfat
NO : Nitrik Oksit
SOD : Superoksit Dismutaz
CYP450 : Sitokrom p450
EDRF : Endotel Derive Relaksing Faktör
nNOS : Nöronal Nitrik Oksit Sentetaz
iNOS : İndüklenebilir Nitrik Oksit Sentetaz
NOS : Nitrik Oksit Sentetaz
IL : İnterlökin
TNF-α : Tümör Nekrozis Faktör-α
INF-γ : İnterferon Gama
C : Kompleman
IgM : İmmunglobulin M
NSAID : Non-steroid Antiinflamatuar İlaçlar
PGI_2 : Prostoglandin I_2
TXA_2 : Tromboksan A_2
AC : Akciğer
MOY : Multipl Organ Yetmezliği
ADP : Adenozin Difosfat
CK : Kreatin Kinaz
MHC : Major Histocompatibility Complex (Major Doku Uyumu Kompleksi)

UW	: University of Wisconsin
^{o}C	: Santigrad Derece (Sıcaklık Ölçüm Birimi)
PGE_1	: Prostoglandin E1
rt-PA	: Rekombinant Tissue Plazminojen Aktivatörü
IU	: İnternational Unit (Uluslar Arası Ünite) (Biyokimya Ölçüm Birimi)
µg	: Mikrogram (Ağırlık Birimi)
CO	: Karbon Monoksit
HO-1	: Hemoksijenaz-1
IL	: İnterlökin
cGMP	: Siklik Guanozin Monofosfat
MAPK	: Mitojen Aktive Protein Kinaz
PAF	: Platelet Aktive Edici Faktör
CYP	: Sitokrom
SH	: Tiyol (Sülfhidril)
mg	: Miligram (Ağırlık Birimi)
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
AST	: Aspartat Aminotransferaz
BNP	: Beyin Natriüretik Peptid
ANP	: Atriyal Natriüretik Peptid
NAD^{+}	: Nikotinamid Adenin Dinükleotid
i.p.	: İntraperitoneal (İlaç Enjeksiyon Metodu)
ICG	: İndosiyanin Yeşili
ATADEM	: Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi
G	: Gauche (Enjektör İğnesinin Kalınlık Birimi)
cc	: Cubic Centimeter (Kübik Santimetre) (Hacim Birimi)
nm	: Nanometre (Işık Dalga Boyu Ölçüm Birimi)
SPSS	: Statistical Package for the Social Sciences (İstatistik Programı)
SS	: Standart Sapma (İstatistik birimi)
Q	: Kuartil (Çeyrek Değer) (İstatistik birimi)
Gr	: Gram (Ağırlık Birimi)
G	: Grup
HIF_1-α	: Hipoksi İnduced Faktör 1- α

1. GİRİŞ ve AMAÇ

İskemi, çeşitli nedenlerden dolayı dokulara ulaşan kan akımının azalması ya da sağlanamamasıdır. Hipoksik doku hasarı, iskemi sonucunda oluşur. Uzun süren iskemi, hücresel bütünlük kaybına ve hücre ölümüne neden olur (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015).

Akut ekstremite iskemisi, yüksek morbidite, mortalite ve maliyetler içeren bilinen en yaygın periferik vasküler acil durumlardan birisidir. Cerrahi ve farmakolojik revaskülarizasyon yöntemlerindeki gelişmelere rağmen tedavisinde tam bir fikir birliği oluşmamıştır. İskemi sonrası ortaya çıkan tüm sonuçlara bağlı ölüm oranı hala %25'in üzerindedir, hayatta kalanların ise %20'si major ampütasyon riskiyle karşı karşıya kalmaktadır (Dick, Li et al. 2008).

Reperfüzyon ise iskemik dokuya kan akımının yeniden sağlanmasıdır. Reperfüzyon esnasında özellikle dokularda biriken polimorfonükleer lökositlerden (PMNL) serbest oksijen radikallerinin salınımı, doku yıkımını hızlandırır. Bu süreç sonucunda ortaya çıkan klinik duruma ise reperfüzyon hasarı adı verilir (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). Geleneksel olarak iskemik durumların tedavisinde klinik yönetim, reperfüzyon ilişkili hasara özel bir ehemmiyet göstermeden erken doku reperfüzyonunu amaçlamaktadır. İskemik olan dokuya mümkün olan en kısa sürede ve tamamen kan akımının sağlanması, paradoksal olarak bir dizi inflamatuar yanıtı harekete geçirip, lokal doku yıkımını artırıp toksik metabolitlerin sistemik yayılımını artırarak ve mikrovasküler damarlarda no-reflow fenomeninin oluşmasını kolaylaştırarak önceki doku hasarını daha da kötüleştirebilir (Dick, Li et al. 2008). İskemi-reperfüzyon (I/R) hasarının neden olduğu lokal ve sistemik etkiler sıklıkla cerrahi esnasında görülür ve sonuç olarak postoperatif morbidite ve mortaliteyi etkiler. I/R sendromu olarak da bilinen bu klinik durum; iskelet kası, kalp, akciğer, böbrek, santral sinir sistemi gibi multipl doku ve organda hasar oluşturabilir (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). Myokard enfarktüsü, inme, organ nakli ve kardiyovasküler cerrahi geçiren hastaların prognozunu reperfüzyon sonrası oluşan bu geniş hasar etkilemektedir (Khalil, Aziz et al. 2006).

I/R hasarının tedavisindeki ilerlemeler, plastik cerrahi alanında özellikle flepler ve replante dokularda oluşan hasarların tedavisinde yeni tedavi seçenekleri ortaya çıkarmıştır.

I/R hasarı geniş doku defektlerinin onarılmasında plastik cerrahların elinde büyük bir silah olan ve zamanla yarışılan serbest doku nakilleri cerrahisi için kritik bir öneme sahiptir. Flep başarısızlığı pedikülün mekanik obstrüksiyonu, sistemik hastalık, no-reflow fenomeni gibi global kan akımı yetersizliği nedenleriyle oluşur. Genel olarak deri ve fasya dokusu, kas dokusuna göre iskemiye daha dirençlidir ve 2 saatten fazla süren normotermik iskemi düzensiz nekroz alanları üretmeye başlar. Reperfüzyon uzun süren iskemiden sonra flep dokusunda oluşan hasarın esas sebebidir (Khalil, Aziz et al. 2006). Serbest doku nakli sırasında ya da sonrasında dokuların I/R hasarına uğraması ve bu hasarla başa çıkılamaması neticesinde, doku nekroza uğramakta, en masum komplikasyon olarak nakil edilen doku kaybedilmekte ve kliniğin ilerlemesi hastanın hayatını dahi tehdit edebilecek komplikasyonlara neden olabilmektedir.

İskelet kaslarının reperfüze olmasıyla metabolik asidoz ve hiperkalemi gibi önemli metabolik değişikliklere neden olan asit metabolitleri ve hücre yıkım ürünleri dolaşıma katılır (Souza Júnior, Moreira Neto et al. 2013). Aktive PMNL sayısının artışı, I/R hasarı sonucu indüklenmiş doku hasarıyla birlikte iskelet kası hasarının da artmasına yol açar. Parmakların ve ekstremitelerin reimplantasyonu reperfüzyon hasarının farklı bir spektrumuyla sonuçlanabilir çünkü tamamen iskemik olan bir ekstremitenin reimplantasyonu, uzak organ hasarına neden olabilir (Khalil, Aziz et al. 2006). Bu hasar neticesinde en masum komplikasyon olarak hasta, reimplante edilen ekstremitesini kaybetmekte hasar ilerlediğinde ise hasta böbrek, kalp, akciğer yetmezliği gibi komplikasyonlar sonucunda hayati risk ile karşı karşıya kalabilmektedir.

I/R hasarının tedavisinde tam bir fikir birliği oluşmaması ve açığa çıkan komplikasyonlar nedeniyle hastanede yatış süresinin uzaması, tedavi maliyetlerini de artmaktadır. Mevcut tedavi ajanlarının çok başarılı olmaması ise en masum komplikasyon olarak hastanın ekstremite kaybına yani amputasyona neden olmaktadır. Ekstremitenin amputasyonu ise işgücü kaybına neden olmakta ve bu durum hem hasta hem de ülke

açısından ciddi bir ekonomik kayba neden olmaktadır. I/R hasarının neticesinde böbrek, kalp ve akciğer gibi multipl organların yetmezliği sonucu hastaların organ nakli endikasyonu oluşmaktadır. Multipl organ yetmezliği ve dissemine intravasküler koagülasyon komplikasyonları neticesinde ise hayati risk oluşmakta ve tedavi edilemediğinde ise hasta yaşamını yitirmektedir (Dick, Li et al. 2008). Tüm bu komplikasyonlar neticesinde tedavi maliyetleri tahmin edilemeyecek boyutta artmakta ve ülke ekonomileri büyük zarar görmektedir.

Alt ekstremitede oluşan I/R hasarının önlenmesinde birçok farmakolojik ilaç kullanılmış ve bu alanda birçok çalışma yapılmıştır. Karbonmonoksit Releasing Molekül-3 (CORM-3), hücre içi siklik GMP (cGMP) üretimini artıran, vazorelaksasyondan sorumlu potasyum (K^+) kanallarını aktive eden, suda çözünebilen ve mikrovasküler perfüzyonu koruyup, iskemiye bağlı inflamasyonu ve hasarı azaltan bir moleküldür (Alshehri, Bourguignon et al. 2013, Bihari, Cepinskas et al. 2017). I/R hasarında kullanılan bir diğer molekül olan Gingko biloba ekstresi (GbE) ise, gingko ağacı yapraklarından elde edilen, %24 flavonoid glikozidi ve %6 karakteristik terpenoid (gingkolid ve bilobalid) içeren vasodilatör ve antioksidan etkileri olan bir maddedir (Sambuy, Costa et al. 2012). I/R hasarında rutin kullanıma girmiş olan iki molekül daha mevcuttur. Bunlardan birincisi olan N-Asetilsistein (NAC), doğal bir aminoasit olan L-sisteinin asetillenmiş türevi olan güçlü bir antioksidandır ve hücre içi glutatyon seviyesini artırarak etki gösterir. İlave olarak hipokloröz asit, hidrojen peroksit, superoksit maddeleri gibi reaktif oksijen radikal kurtarıcısıdır (Knight, MacPhadyen et al. 1991, Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). İkinci molekül olan Pentoksifilin ise, bir ksantin türevi olup, fosfodiesteraz-5 enzim inhibisyonu yapar. Hücre içi siklik AMP (cAMP) düzeyini arttırarak etki gösterir. Proinflamatuar sitokin üretimini azaltarak endotel fonksiyonu ve doku oksijenizasyonunu artırır (Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). Çalışmamızda kullanacağımız Pentoksifilin ve NAC I/R hasarında kliniklerde rutin kullanıma girmiş antioksidan, antienflamatuar ve vazodilatör etkili iki ilaçtır. Deneysel bir molekül olan CORM-3 ve bitkisel bir ürün olan GbE de alt ekstremite I/R hasarında kullanılabilecek olan antioksidan, antienflamatuar ve vazodilatör etkili ajanlardır.

Sonuçların anlamlı çıkması, klinik uygulamalara translasyon gösterebilecek ve I/R hasarında rutin olarak kullanılan NAC ve Pentoksifilin moleküllerinin yerine yeni tedavi seçenekleri veya kombinasyonları ortaya çıkarabilecek ve böylece hasta refahına ve ülke ekonomisine katkı sağlanabilecektir.

.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. I/R Hasarının Tarihçesi

I/R hasarının varlığına ilişkin ilk ipucu, 1960' larda büyük arterlerin uzun süreli klemp edilip, kan akımının restorasyonu sonucu asidoz ve sistemik şok tablosu gelişmesiyle dikkat çekmiştir. Bu klinik durum deklemping şok olarak adlandırılmıştır (Baue and McClerkin 1965, Vetto and Brant 1968). Günümüzde ise, deklamping şok tablosunun sadece toksik metabolitlerin iskemik dokularda birikmesinden ibaret olmadığı anlaşılmıştır.

Reperfüzyon hasarı ilk kez Cerra ve arkadaşları tarafından 1975 yılında tanımlanmıştır (Cerra, Lajos et al. 1975). Cerra ve arkadaşları ilk olarak, reperfüzyon hasarının yayılımını araştırmak için köpek myokard pediküllerinde kan akımı restorasyonunun, subendotelyal hemorajik nekroz ile ilişkili olduğunu gösteren bir deney modeli tasarladılar. Elde edilen deney sonucu, aort kapak replasmanı sonucu ölen 25 hastanın klinik notları ve otopsi sonuçlarını gözden geçirmek için bir ilham verdi. Otopside subendotelyal hemorajik nekrozu olan ve 70 dakikadan daha uzun süre kardiyopulmoner bypass uygulanan 5 hastanın reperfüzyon hasarı sonucu ölmüş olabileceğine karar verildi. Böylece reperfüzyon hasarının, aort kapak replasmanı sonrası gelişen myokard enfarktüsünün en yaygın sebebi olduğu kararına vardılar.

No-reflow fenomeni hakkında plastik ve rekonstruktif cerrahi literatüründe çok sayıda çalışma ve yayın bulunmaktadır. Bu fenomen, reperfüzyon sırasındaki ilerleyici vasküler hasar ve genişleyen zayıf kan akımı bölgesinden oluşur (Khalil, Aziz et al. 2006). May ve arkadaşları 1978 yılında no-reflow fenomenini deneysel serbest flep modelinde tanımladılar ve bu fenomeni hücresel şişme, damar içi trombosit agregasyonu, intravasküler alandan hücreler arası alana sıvı kaçışıyla karakterize bir hipotez olarak tanımladılar (May, Chait et al. 1978). I/R hasarı hakkında literatürdeki ilk çalışmalardan birisi de Parks ve arkadaşlarının 1986 yılında I/R hasarına uğramış kedi bağırsağındaki patolojik değişiklikleri gösterdiği çalışma olmuştur. Bu çalışma iskelet kası dokusunun birkaç saat, nöronal ve gastrointestinal sistem dokularının ise sadece dakikalarla ifade

edilecek şekilde iskemiye dayanabileceğini kanıtlamıştır (Abela and Homer-Vanniasinkham 2003).

İskemik dokulara kan akımının yeniden sağlanmasıyla ekstremitede oluşan iskemi-reperfüzyon hasarının önlenmesinde birçok farmakolojik ilaç kullanılmış ve tarihsel gelişim sürecine de bakıldığında bu alanda birçok çalışma yapılmıştır. Son on yılda I/R hasarının neden olduğu komplikasyonların farkına varılmasına rağmen, I/R hasarının kompleks patofizyolojik mekanizması ve potansiyel tedavi edici ajanların yetersiz kalması, araştırmacıları yeni molekül ve ilaçların arayışına yöneltmiştir.

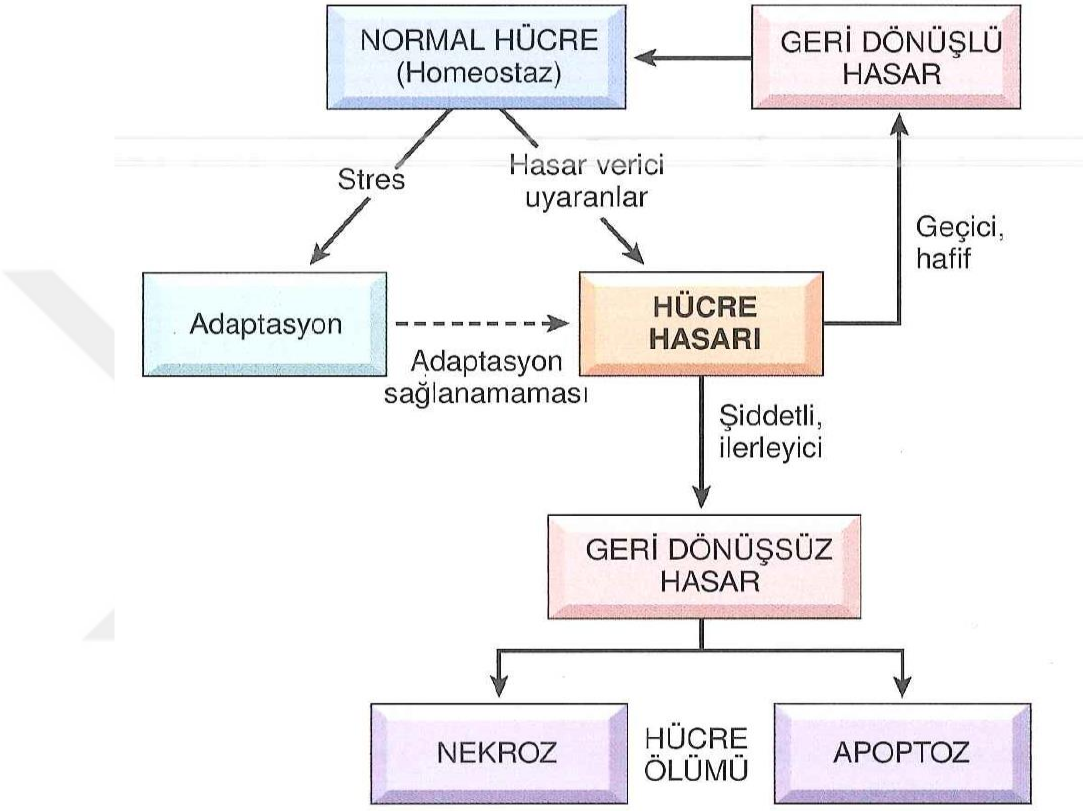
2.2. I/R Hasarı ve Patofizyolojik Gelişim Mekanizması

2.2.1. Hücre Zedelenmesi ve Nekroz

Hücreler çevrelerinde olup bitenlere aktif olarak katılırlar; yapı ve fonksiyonlarını değişen gereksinimlere ve hücre dışı streslere göre sürekli olarak ayarlarlar. Hücreler, hücre içi ortamı sınırları oldukça dar olan fizyolojik parametrelerde tutmaya çalışırlar; başka bir deyişle, normal homeostasisi sürdürürler. Hücreler fizyolojik streslerle veya patolojik uyaranlarla karşılaştıklarında, uyum gösterip canlılıklarını ve işlevlerini koruyarak yeni bir denge durumuna (‘’steady state’’) ulaşabilirler. Başlıca uyum yanıtları hipertrofi. hiperplazi, atrofi ve metaplazidir. Uyum yeteneği aşılırsa veya dış stres doğrudan zararlıysa, hücre zedelenmesi meydana gelir (Şekil 1), (Kumar, Abbas et al. 2017).

Belirli sınırlar içinde zedelenme geri dönüşlüdür ve hücreler stabil bir çizgiye dönebilirler; öte yandan, ağır veya uzun süren stres geri dönüşsüz zedelenme ve etkilenen hücrelerin ölümü ile sonlanabilir. Hücre ölümü, herhangi bir doku veya organdaki hastalığın ilerlemesinde en belirleyici olaylardan birisidir. Geri dönüşsüz hücre zedelenmesinin yani hücre ölümünün kesin bir biyokimyasal veya morfolojik eşdeğeri yoksa da, onu tutarlı biçimde karakterize eden iki fenomen vardır:

1- Başlangıçtaki zedelenmenin ortadan kalkmasına karşın mitokondri disfonksiyonunun düzelmeyişi (oksidatif fosforilasyon ve Adenozin Trifosfat (ATP) üretiminin olmaması)
2- Membran fonksiyonlarında ağır bozukluklar



Şekil 1. Stres ve zedeleyici uyaranlara karşı hücresel yanıtın evreleri

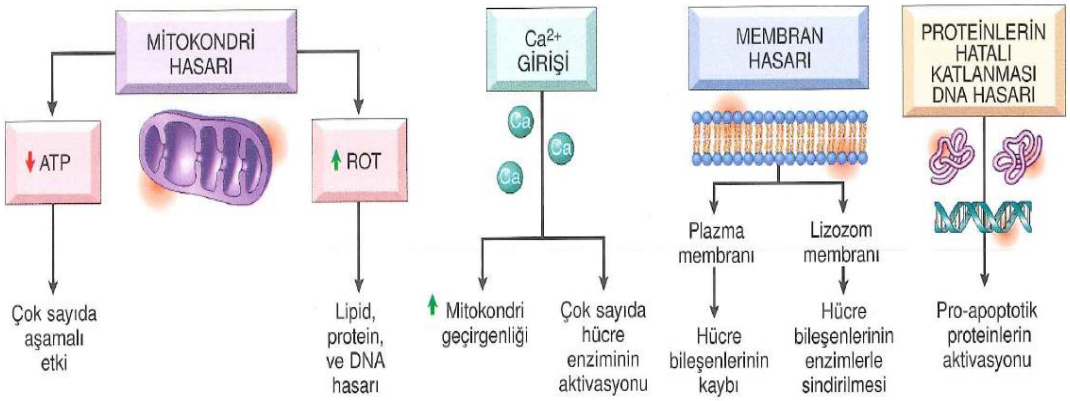
Morfolojileri, mekanizmaları ve hastalıklardaki patolojik rolleri farklı olan nekroz ve apopitoz olmak üzere iki tip hücre ölümü vardır. Membran zedelenmesi şiddetli olduğunda, enzimlerin lizozomlardan dışarı çıkması, sitoplazmaya geçmesi ve hücreyi sindirmesi ile nekroz meydana gelir. Hücre içeriği, zedelenen plazma membranından çevreye yayılır ve konak yanıtını (inflamasyon) başlatır. İskemi, toksinler, infeksiyonlar, bağışıklık reaksiyonları ve travma gibi sık karşılaşılan pek çok zedelenmede ana hücre ölümü yolu nekrozdur. Büyüme faktörlerinden yoksun kalındığında, Deoksiribonükleik asit (DNA) 'sı veya proteinleri onarılamayacak düzeyde zedelendiğinde; hücre kendini, apoptoz olarak adlandırılan ve membran devamlılığı tam olarak ortadan kalkmadan

çekirdeğin dağılması ile karakterize olan bir yolla öldürür. Nekroz her zaman patolojik bir süreç olmasına karşın apoptoz, çok sayıda normal fonsiyona katkıda bulunur ve patolojik hücre zedelenmesi ile birlikte olması gerekmez.

Hücre zedelenmesi, birkaç esansiyel hücre bileşenlerinden birinde veya daha fazlasında ortaya çıkan biyokimyasal veya fonksiyonel anormalliklerden kaynaklanır (Şekil 2), (Kumar, Abbas et al. 2017).

Zedeleyici etkenlerin en önemli hedefleri şunlardır:

1- ATP üretim yeri olan mitokondriler
2- Hücrelerin ve organellerinin iyonik homeostazının bağımlı olduğu hücre membranları
3- Protein Sentezi
4- Hücre İskeleti
5- Hücrenin genetik donanımı



Şekil 2. Hücre zedelenmesinde başlıca hücresel ve biyokimyasal zedelenme yerleri

ATP düzeyinin noemalin %5-10 una inmesi pek çok kritik hücresel sistemi geniş biçimde etkiler (Şekil 3), (Kumar, Abbas et al. 2017):

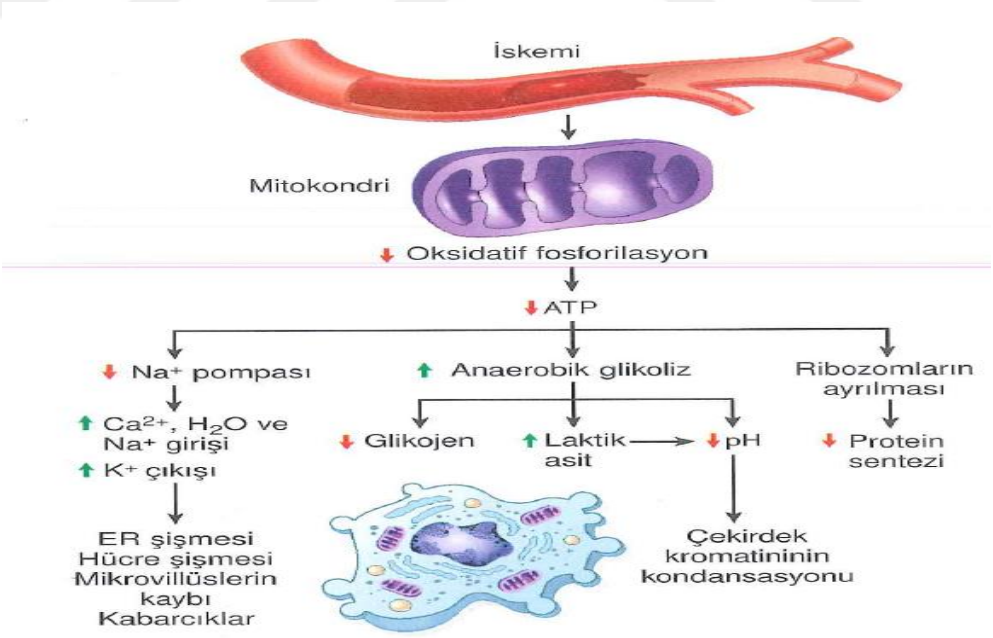
- Plazma membranında enerji bağımlı Sodyum (Na^+) pompasının aktivitesi azalır bu da hücre içi Na+ birikimine ve dışarı potasyum (K^+) kaçışına neden olur.

Eriyebilen maddelerdeki net artışı iso-ozmotik olarak su tutulmasının izlemesiyle endoplazmik retikulum (ER) genişler, hücre şişer.

- Hücreye enerji sağlayabilmek için kompansatuar olarak anaerobik glikoliz artar.

- İskemi ve belli toksinler, başlangıçta hücre içi depolardan Kalsiyum (Ca^{+2}) salınmasıyla daha sonra da Ca^{+2} pompasının yetmezliği sonucu plazma memranından hücre içine Ca^{+2} geçişi sitozolik Ca^{+2} konsantrasyonunun artmasına neden olur ve çok sayıda hücre içi bileşen üzerinde zararlı etkiler meydana gelir.

- ATP kaybının uzun sürmesi veya kötüleşmesi ile ribozomların düz endoplazmik retikulumdan ayrılması ve polizomların monozomlara dağılması ile protein üretimi donanımında yapısal bozukluk oluşur, böylece protein sentezi azalır. Sonuçta mitokondri ve lizozom membranlarında geri dönüşsüz zedelenme meydana gelir ve hücre nekroza uğrar.



Şekil 3. Hücre içindeki ATP kaybının fonksiyonel ve morfolojik sonuçları

Reaktif oksijen türleri (ROT), hücre zedelenmesindeki rolleri iyi belirlenmiş olan bir tür oksijen kaynaklı serbest radikallerdir. Bunlar normal olarak hücrede mitokondriyal

solunum ve enerji üretimi sırasında üretilirler ama hücrelerin savunma sistemleri tarafından parçalanır ve ortadan kaldırılırlar. Reaktif oksijen türlerinin üretimi fazlalaştığında veya ortadan kaldırma sistemleri etkisiz kaldığında, miktarında artış sonucu, oksidatif stres oluşur. Pek çok durumda hücre zedelenmesi, serbest radikaller tarafından gerçekleştirilir. Bunlar arasında iskemi-reperfüzyon, kimyasal zedelenme, radyasyon zehirlenmesi, oksijen ve diğer gazların toksisitesi, hücresel yaşlanma, fagositik hücrelerin mikropları öldürmeleri ve inflamatuar hücrelerin neden olduğu doku zedelenmesi vardır (Kumar, Abbas et al. 2017).

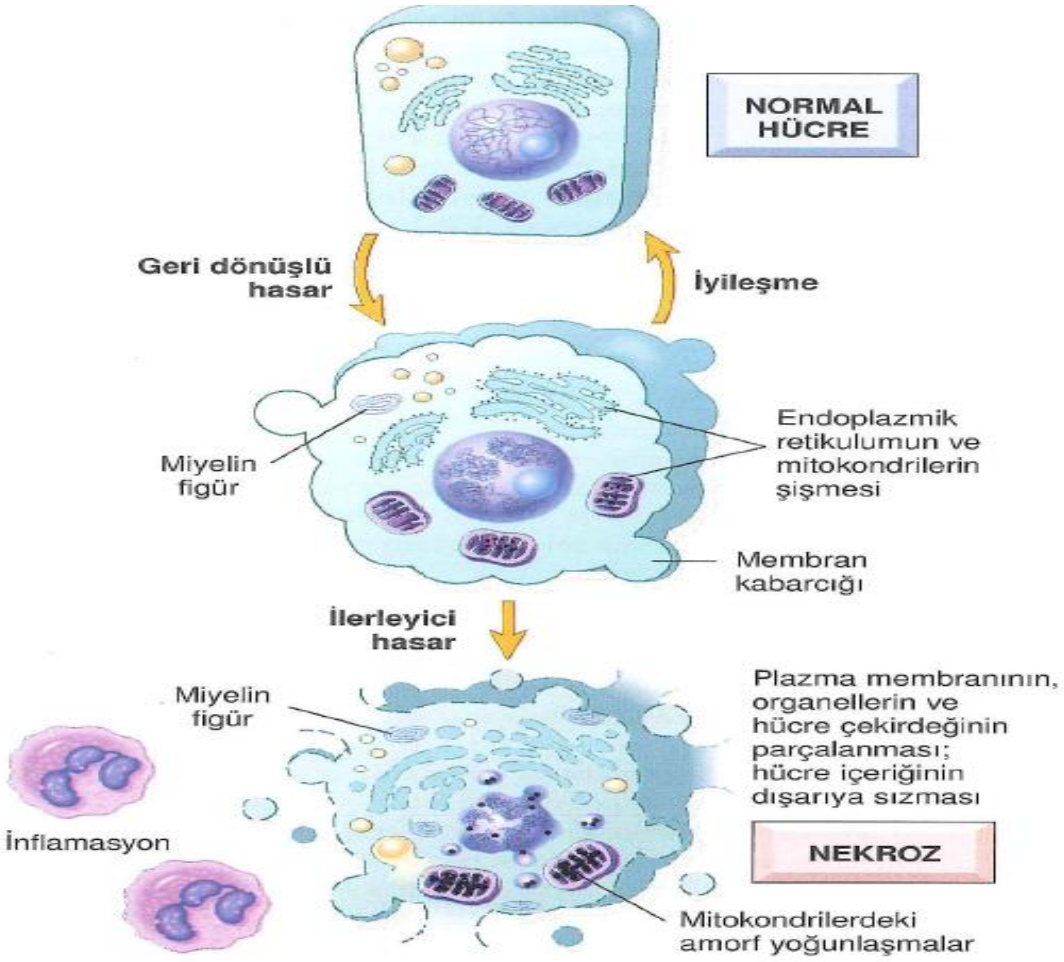
2.2.2. İskemik ve Hipoksik Zedelenme

İskemi, başka bir deyişle dokuya gelen kan miktarının azalması, klinik tıpta en sık görülen hücre zedelenmesi nedenidir. Anaerobik glikoliz ile enerji üretiminin devam edebildiği hipoksinin aksine; iskemide, glikoliz için gerekli maddelerin ortama getirilmesinde de sorun vardır. Bu yüzden, iskemik dokularda potansiyel substratlar tükendiğinde veya normalde kan akımıyla uzaklaştırılacak metabolitler glikolizi inhibe ettiğinde anaerobik enerji üretimi de durur. Dolayısıyla, iskemi dokuları hipoksiden daha hızlı zedeler.

Hipoksik hücrelerde hücre zedelenmesine neden olan asıl biyokimyasal anormallik, azalan oksijen nedeniyle hücre içi ATP üretiminin düşmesidir. ATP nin kaybı, iyon pompalarındaki hasar sonucu hücrenin şişmesine ve hücre içine Ca^{+2} girişine, glikojen depolarının boşalıp laktik asit birikimi ve hücre içi pH azalmasına, protein sentezinin azalması ve çok sayıda enerjiye bağımlı hücre sisteminin yetmezliğine neden olur. Hipoksi devam ederse; derinleşen ATP eksikliği, bozuklukların daha da artmasına, mikrovillusların kaybına ve kabarcıklar oluşmasına neden olur. Bu dönemde, hücrenin tümü organelleriyle (mitokondri, ER) birlikte belirgin olarak şişmiş; H_2O, Na^+ ve Klor (Cl^-) konsantrasyonları artmış; K^+ konsantrasyonu azalmıştır. Yeniden oksijen sağlanırsa, tüm bu değişiklikler geri dönüşlüdür.

İskemi devam ederse, geri dönüşsüz zedelenme (ilerleyici hasar) ve nekroz meydana gelir. Geri dönüşsüz zedelenmede mitokondrilerin ve lizozomların ileri

derecede şiştiği, plazma membranlarında ağır hasar olduğu görülür. Ölüm genellikle nekroz yoluyladır ancak, apoptozisin de katkısı vardır (Kumar, Abbas et al. 2017) (Şekil 4), (Kumar, Abbas et al. 2017).



Şekil 4. Normal bir hücrenin geri dönüşlü ve geri dönüşsüz zedelenmede gösterdiği değişiklikler

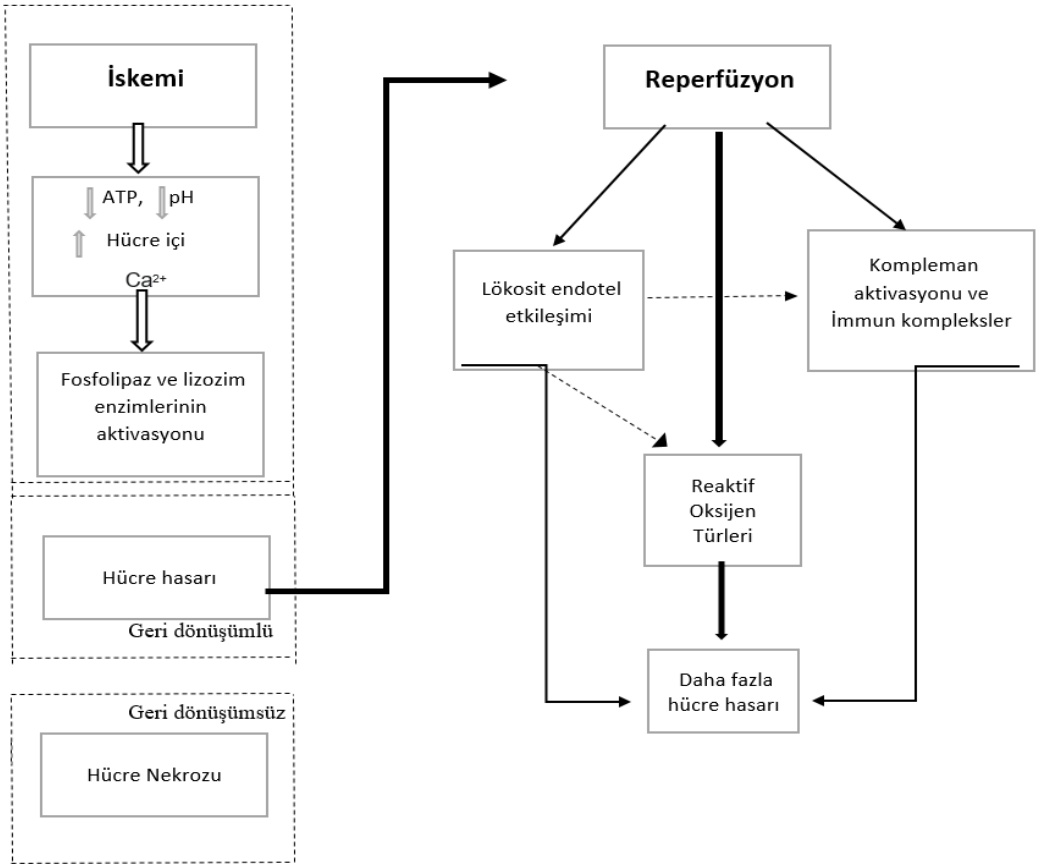
2.2.3. I/R Hasarı ve Gelişim Mekanizması

Hücreler geri dönüşlü biçimde zedelenmişlerse; kan akımının yeniden sağlanması, hücrelerin iyileşmesi ile sonuçlanabilir. Ancak; bazı durumlarda iskemik fakat canlı olan dokuda kan akımının yeniden sağlanması, paradoksal olarak zedelenmenin artması ve hızlanması ile sonuçlanır. Bunun sonucunda, dokularda iskemik dönemin sonunda geri dönüşsüz zedelenenlere ek olarak hücre kaybı yaşanır. I/R hasarı olarak adlandırılan ve klinik olarak önemli olan bu süreç, iskemiye uğrayan dokudaki zedelenmenin artmasında

önemli rol oynayabilir (Kumar, Abbas et al. 2017). I/R hasarı, myokard enfarktüsü, inme, damarsal hastalıklar, organ nakli ve şok olmak üzere birçok klinik bozukluğun temelini oluşturur. Perfüzyon değişikliğinin yol açtığı hücre, doku-organ hasarı, komplikasyonların ana sebeplerinden birisi olduğu için I/R hasarı özellikle plastik cerrahi alanıyla ilgilidir. İskemi tarafından tetiklenen doku hasarının büyük bir bölümünün, sıklıkla iskemik dokuların reperfüze olmasıyla ilişkili olayların bir sonucu olan reperfüzyon hasarı adı verilen patolojiyle ilişkili olduğu kanıtlanmıştır (Mathes and Hentz 2006). I/R hasarı, reaktif oksijen radikalleri, kompleman sistem aktivasyonu, artmış lökosit-endotel hücre adhezyonu, artmış platelet-lökosit agregasyonu, interstisyel alanda sıvı birikimi, diffüz mikrotromboz, azalmış endotel-bağımlı vasorelaksasyon patofizyolojisiyle hasara neden olur (Dick, Li et al. 2008).

İskemiden kaynaklanan hücresel hasar konusunda hücre kültür sistemleri, deney hayvanları ve insanlar üzerinde birçok çalışma yapılmıştır. Dokuların iskemiye karşı toleransı hücrenin tipi ve yaşına bağlı olarak değişebilir. Normotermik sıcaklıklarda insan iskelet kaslarının kritik iskemi zamanı 2 saatten fazla iken, yaklaşık olarak 30 dakikalık bir iskemi süresi jejenum dokusunda histolojik değişikliklerin oluşması için yeterlidir. Kalp kası için de bu kritik süre 20-30 dakika arasındadır (Khalil, Aziz et al. 2006, Kumar, Abbas et al. 2017).

İskeminin erken fazlarında ATP glikoliz yoluyla sağlanabilir. Ancak hücrede bulunan glikojen depolarının tükenmesiyle laktat ve diğer toksik metabolitler hücre içerisinde birikmeye başlar. Bu durum Fosfolipaz A2 ve Lizozim gibi kimyasal mediatör ve enzimlerin aktive olmasını tetikler. Fosfolipaz A2, inflamatuar mediatörlerin prekürsörü olan Lökotrienler ve Prostoglandinler gibi hücre membranı fosfolipidlerini araşidonik aside (AA) dönüştürür. Proteolitik bir enzim olan Lizozim ise patojenlerin ve nekrotik hücrelerin sindirilmesini sağlar (Şekil 5), (Khalil, Aziz et al. 2006).



Şekil 5. İskemi ve reperfüzyon sırasında meydana gelen olayların sırası

2.2.3.1. Lökosit-Endotel Reaksiyonları

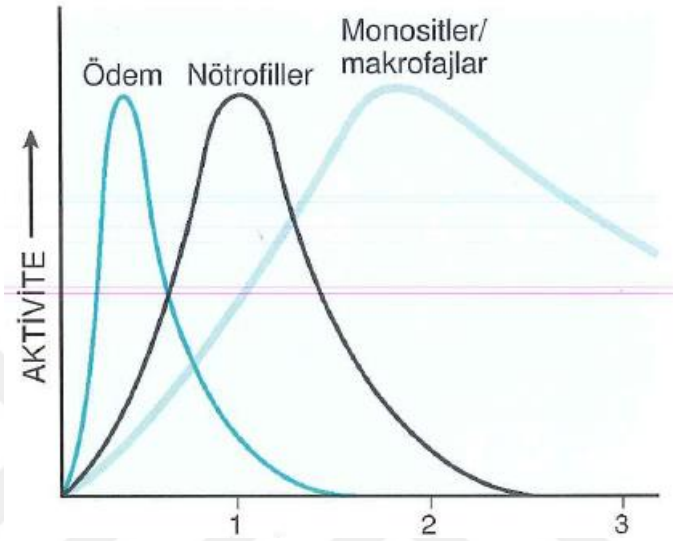
Lökositler, mikrovasküler ve parankimal hasar esnasında primer rol oynar (Bihari, Cepinskas et al. 2017). Dokuda PMNL birikimiyle doku hasarı arasında yakın bir ilişki olduğunu, dolaşımda PMNL' lerin yok edildiği modellerde hasarın azaldığını, bu yüzden I/R hasarında PMNL' lerin önemli bir rolü olduğu çalışmalarda göstermiştir. PMNL' lerin damar içi hızlı birikimi, ilerleyici bir şekilde perfüzyonda azalmaya yol açabilir ve iskemi ve sonrasında gelişen reperfüzyonla ilişkili ''no-reflow'' fenomenini ya da daha açık olarak bir ''azalan-yeniden akım'' fenomenini temsil edebilir. Birkaç mekanizma vasıtasıyla aktive PMNL'ler I/R ortamında hasara yol açabilir:

1- Adheren, aktive PMNL' ler direkt endotelyal hasar sonucu damar bütünlüğü kaybı, ödem, hemoraji ve tromboza neden olabilir.

2- Damar lümeni içerisinde PMNL kümelerinin adheransı ve birikimiyle sonuçlanan mikrovasküler tıkanıklık ve ilerleyici iskemi (Mathes and Hentz 2006).

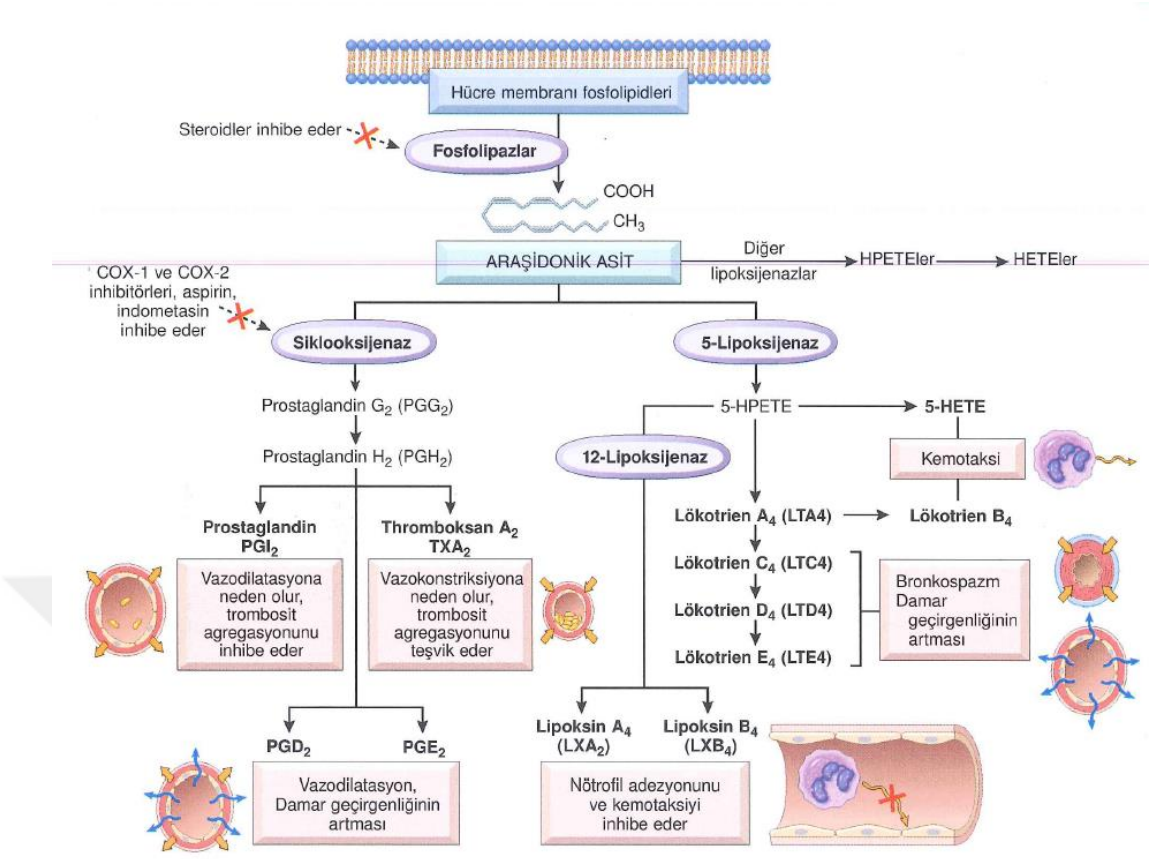
Lökosit-endotel reaksiyonlarını daha iyi anlamak için AA metabolitlerinin (eikosanoidler) oluşumunu ve etki mekanizmalarını kavramak lazımdır. AA metabolitleri inflamasyonun neredeyse her basamağına aracılık edebilir ve sentezleri inflamatuar yanıt bölgelerinde artar. Yapıldıkları yerde lokal olarak etki ederler ve daha sonra spontan olarak azalır veya enzimatik olarak yok edilirler. Lipoksijenaz ve siklooksijenaz yoluyla salgılanan kimyasal mediatörler lökositler üzerinde kemotaktik etki gösterir. 5-Lipoksijenaz, nötrofillerde baskın olarak bulunan AA metabolizması enzimidir. 5-Hidroperoksieikosatetraenoik (5-HPETE) asit, AA' in 5-hidroperoksi ürünüdür. 5-HPETE oldukça karasızdır ya nötrofiller için kemotaktik olan 5-Hidroksieikosatetraenoik asit (5-HETE)'ye indirgenir ya da topluca lökotrienler diye adlandırılan bileşiklere dönüşür. AA metabolitleri ve esas olarak lökotrienler reperfüzyon hasarının ayırt edici özelliği olarak, lökositlerin vasküler endotelyuma adezyonunu ve postkapiller venüllerin permeabilitesini artırırlar. Vasküler endotelyal hücreler lökositler için bir bağlanma alanı oluşturur. 5- HPETE' den türeyen ilk lökotrien, Lökotrien A_4 (LTA_4) olup sırasıyla Lökotrien B_4 (LTB_4) veya Lökotrien C_4 (LTC_4)' e dönüşür. LTB_4, nötrofillerde ve bazı makrofajlarda üretilir ve nötrofiller için güçlü kemotaktik ajandır. Lökositler, doku zedelenmesinin olduğu yerlerde ekstravasküler dokuda toplanır ve hasarın olduğu bölgeye göç edip, fonksiyonlarını yerine getirmek için aktive olurlar. Lökositlerin toplanması, çok aşamalı bir süreçtir. Lökositlerin vasküler endotelyuma bağlanması P-selektin, L-selektin ve interselüler adezyon molekülleri sayesinde olur. P-selektin ve E-selektin lökositlerin endotele gevşek bağlanıp yuvarlanmasını, integrinler ise sıkıca tutunmasını sağlarlar. Böylece lökositler edotel hücreleri arası aralıklardan göç ederler. Tümör Nekrozis Faktör-α (TNF-α) ve İnterlökin-1 (IL-1) gibi sitokinler, endotelde selektinlerin ve integrin ligandların miktarını ve lökositlerin kemokinlerle birlikte göç etmesini arttırır. Bu sitokinlerin birçoğu, patojenlere veya zedelenmiş dokulara yanıt veren doku makrofajları ve diğer hücreler tarafından yapılmaktadır. Nötrofiller, erken inflamasyonda baskındır ve daha sonra yerine makrofajlar geçer. Reperfüzyon esnasında bu moleküllerin aşırı salgılanması, daha fazla lökosit endotel etkileşimine yol açar. Lökositler daha fazla lökosit toplanması için kemotaktik ajan salgılarlar böylece daha fazla lizozom salgılanarak daha fazla ROT oluştururlar ve

böylece daha fazla I/R hasarı oluşur. Bunun kanıtı olarak lökositlerin yok edildiği deney hayvan modellerinde daha az reperfüzyon hasarı olduğu görülmüştür (Kumar, Abbas et al. 2017) (Khalil, Aziz et al. 2006) (Şekil 6) (Kumar, Abbas et al. 2017).



Şekil 6. Tahmini ödem ve hücresel infiltrasyonların kinetikleri

Lipoksinler ise başlıca inflamasyon inhibitörleri olarak fonksiyon gösterirler. Lökositler, dokulara girer ve lipoksijenaz kaynaklı AA ürünlerini lipoksinlere dönüştürürler. Lipoksinler, nötrofil kemotaksisi ve endotel adezyonunu inhibe ederler, böylece lökositlerin endeojen antagonistleri olarak hizmet ederler. Aktive olan ve lökositlere yapışan trombositler de lipoksinlerin önemli kaynaklarıdır. Trombositler kendi başlarına Lipoksin A_4 ve B_4' ü (LXA_4 ve LXB_4) sentezleyemezler. Fakat bu mediyatörleri, transelüler biyosentetik yolla bitişik nötrofildeki ara üründen yapabilirler. Bu mekanizma ile AA ürünleri, bir hücreden diğerine geçebilir (Khalil, Aziz et al. 2006, Kumar, Abbas et al. 2017), (Şekil 7), (Kumar, Abbas et al. 2017).



Şekil 7. Araşidonik asit metabolitlerinin oluşumu ve inflamasyondaki etkileri

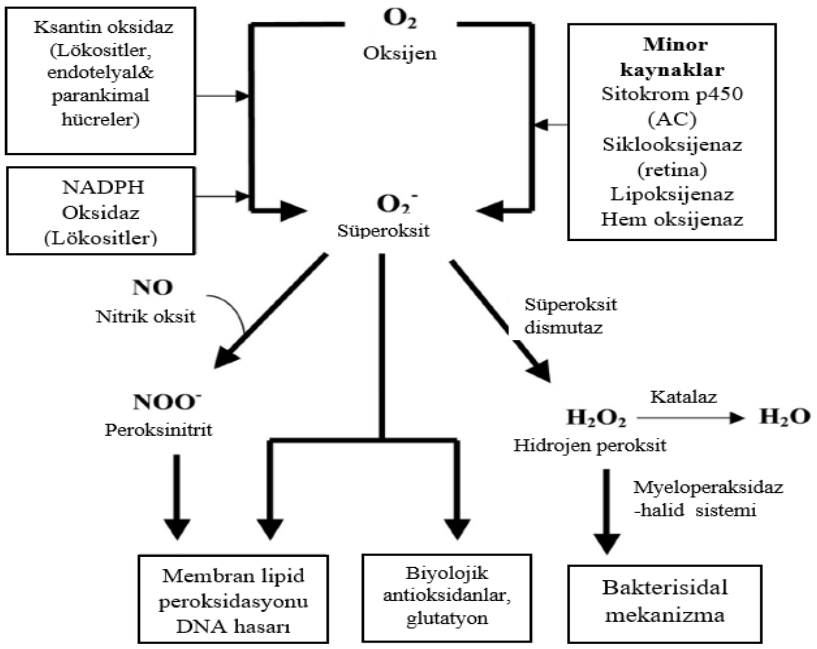
2.2.3.2.Lökosit-Endotel Reaksiyonları

Nikotinamid adenin dinükleotid fosfat (NADPH) oksidaz (fagosit oksidaz) yoluyla sentez edilen reaktif oksijen türleri eşlenmemiş elektronlarıyla oldukça unstabil moleküllerdir. Mikroplar, immün kompleksler, sitokinler ve çeşitli inflamatuar uyaranlar tarafından stimüle edilen nötrofil ve makrofajlardan serbestleşirler. Lizozomlarda reaktif oksijen türleri yapıldığında daha çok Nitrik Oksit (NO)'e benzer şekilde fagosite edilmiş mikropları ve nekrotik hücreleri yok eder. Düşük seviyelerde sekrete edildiğinde reaktif oksijen türleri, kemokin, sitokin ve adezyon molekül ekspresyonunu artırırlar. Yüksek seviyelerde bu mediyatörler, birkaç mekanizmayla doku zedelenmesi yaparlar ve proteinler, lipidler, DNA gibi birçok molekülü oksitleyebilirler. Bu mekanizmalar:

- Trombozis ve artmış permeabilite ile birlikte endotel hasarı

- Ekstraselüler matriksin bozulmasında artış ile birlikte proteaz aktivasyonu ve antiproteaz inaktivasyonu
- Lökositler, trombositler, eritrositler, parankimal hücreler üzerine direkt zedeleyici etki

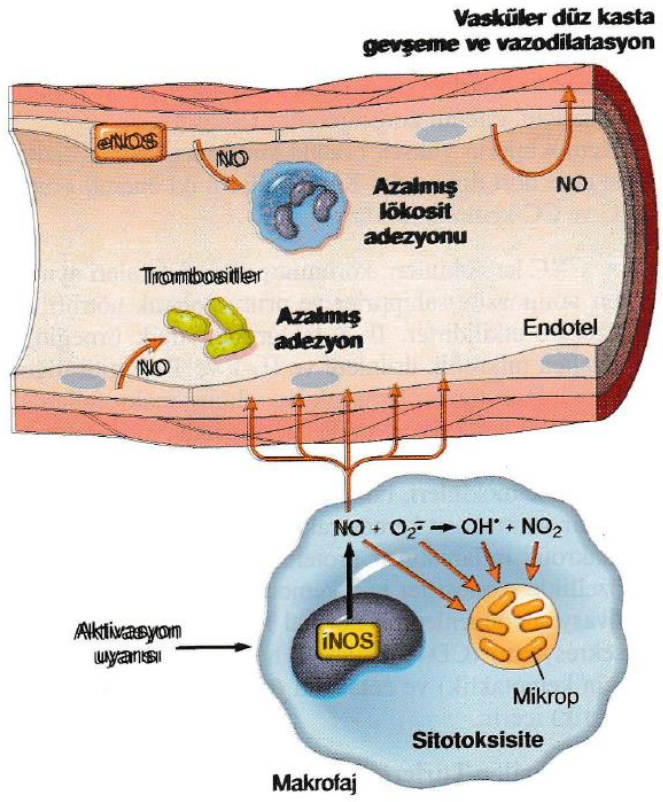
ROT' ların konsantrasyonu esas olarak, glutatyon, Süperoksit Dismutaz (SOD), katalaz gibi antioksidan ajanlar tarafından sıkı bir şekilde düzenlenir. ROT' ların kaynağı hücreden hücreye farklılık gösterebilir. Reperfüzyon sonrası akciğer dokusunda CYP450 ROT' ların ana kaynağı iken, retina endotelyumunda Ksantin Oksidaz ve Siklooksijenaz enzimleri ROT' ların ana kaynağıdır. Lökositlerde ise NADPH oksidaz enzimi reaktif oksijen türlerinin ana kaynağıdır; fakat iskemi durumunda NADPH oksidaz enziminin inhibisyonu reperfüzyon hasarını hafifletmez. ROT özellikle endotelyal hücrelerde lipid peroksidasyonuna neden olarak, trombositler ve lökositler üzerinde etki eder. Lökositlerden salgılanan faktörler vazokonstriksiyon ve platelet agregasyonunu indükleyerek, azalmış doku perfüzyonuna neden olur. ROT' lar NO'ya saldırdığında açığa çıkan peroksinitrit iyonları protein, lipid ve DNA moleküllerini daha fazla oksitlendirir (Khalil, Aziz et al. 2006, Kumar, Abbas et al. 2017) (Şekil 8), (Khalil, Aziz et al. 2006).



Şekil 8. ROT' ların oluşumu ve antioksidan savunma mekanizmaları

2.2.3.3.Nitrik Oksit (NO)

Başlangıçta Endotel Derive Relaksing Faktör (EDRF) olarak adlandırılan NO kısa ömürlü, çözünebilir, çeşitli hücreler tarafından üretilen, çok sayıda fonksiyona aracılık etme yeteneği olan serbest radikal bir gazdır. Endotel hücreleri tarafından yapıldığında damar düz kaslarında gevşemeye ve vazodilatasyona neden olur. De novo olarak L-arginin, moleküler oksijen ve NADPH' den nitrik oksit sentetaz (NOS) tarafından sentezlenmektedir. Doku dağılımındaki farklılıklar açısından NOS' un üç izoformu vardır. Tip I olan nöronal NOS (nNOS), inflamasyonda önemli rol oynamaz. Tip II yani indüklenebilir NOS (iNOS) , makrofaj ve endotel hücrelerinde bulunan uyarılabilir bir enzimdir; İnterlökin-1 (IL-1), Tümör Nekrozis Faktör-α (TNF-α), İnterferon gama (INF-γ) olmak üzere birkaç inflamatuar sitokin ve mediyatörler tarafından uyarılmaktadırlar ve inflamatuvar reaksiyonlarda NO yapımından sorumludur. Tip III (eNOS), primer olarak endotel içinde yapısal olarak sentezlenmiş NOS' dur (Şekil 9), (Kumar, Abbas et al. 2017).



Şekil 9. İnflamasyonda NO kaynakları ve etkileri

NO, inflamasyonda birçok rol oynar. Bunlar:

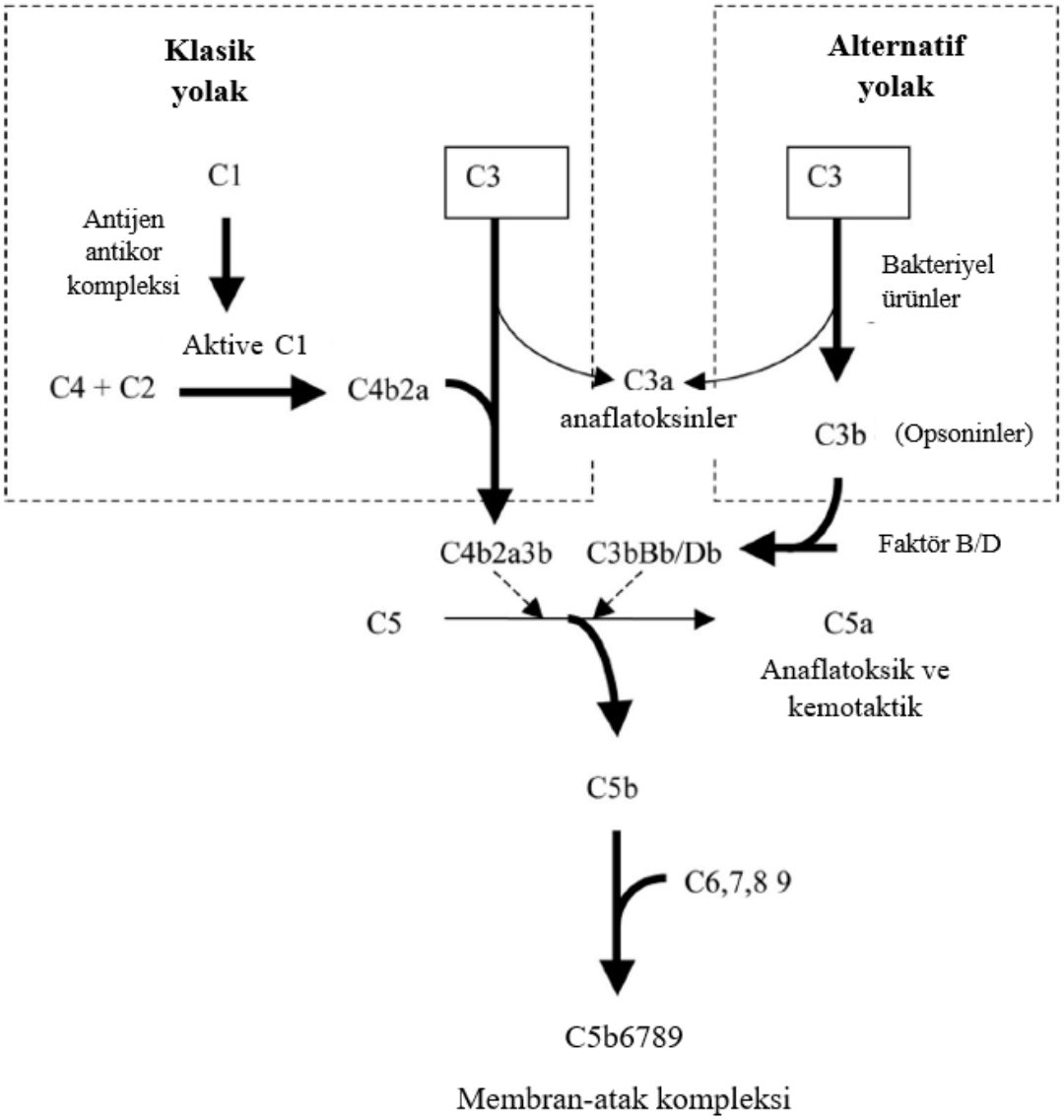
1- Damar düz kas gevşemesi (Vazodilatasyon)
2- Trombosit aktivitesinin adezyon agregasyon ve degranülasyon aşamalarında anatagonist etki
3- İnflamatuar bölgelerde lökosit birikiminin azaltılması
4- Aktive makrofajlarda tek başına veya süperoksit radikalleri ile birlikte mikroorganizmaları öldüren sitotoksik ajan olarak rol oynamaktadır (Kumar, Abbas et al. 2017).

2.2.3.4.Kompleman sistemi, Mast Hücreleri ve İmmün Kompleksler

Kompleman sistemi, hem konakçı savunmasında (immünite) hem de inflamasyonda önemli rolleri olan plazma proteinleridir. Aktivasyonlarıyla vasküler permeabiliteyi ve lökosit kemotaksisini arttırarak inflamatuar yanıta katkıda bulunurlar. Smith ve arkadaşları 1983 yılında reperfüze myokard dokusunda terminal kompleman bileşenlerini tanımlamıştır (Smith, McArthur et al. 1983). Günümüzde ise kompleman sisteminin alternatif yolağının reperfüzyon hasarında anahtar mediatör rolü olduğu anlaşılmıştır. Bu yolağın sonucunda oluşan Membran Atak Kompleksi hücre membranlarında porlar oluşturur. Kompleman sisteminin aktivasyonuyla salınan Kompleman 3a (C3a) ile birlikte anaflatoksik özelliği olmasının yanında kemotaktik bir ajan olan C5a mast hücrelerinin degranülasyonunu uyararak histamin ve diğer kimyasal mediyatörlerin salgılanmasını sağlarlar (Şekil 10), (Khalil, Aziz et al. 2006). Kompleman sisteminden yoksun olan deney hayvanı modellerinde reperfüzyon hasarının oluşmadığı görülmüştür.

Son yapılan çalışmalarda antikor komplekslerinin reperfüzyon esnasında oluştuğu ileri sürülmüştür. Klasik yolak aracılığıyla self-reaktif İmmunglobulin M (IgM) antikorunun tanınması ve kompleman aktivasyonu spesifik antijen gerekliliğini ortaya koymuştur. Zhang ve arkadaşları, IgM antikorunun, genetik olarak immün yetmezliği olan ve intestinal I/R modeli oluşturulan farelerde hasarlı dokularda C3,C4 ve IgM kompleman biriktirdiğini kanıtlayarak, IgM' nin patojenik hasarı onarabileceğini

bildirmişlerdir (Zhang, Austen et al. 2004). Bu çalışmayla spesifik self-antijen doğrulamasının, reperfüzyon hasarını azaltarak yeni bir tedavi yaklaşımı sağlayabileceği düşünülmüştür (Khalil, Aziz et al. 2006).



Şekil 10. Kompleman Kaskadı

Mast hücreleri, vücut boyunca bağ dokuda geniş dağılım gösteren nöbetçi hücrelerdir. Hem akut hem de kronik inflamatuar yanıta katılabilirler. Mast hücreleri histamin ve AA metabolitlerini salgılayarak akut inflamasyonun erken vasküler değişikliklerine neden olur. Ayrıca mast hücreleri, TNF-α ve kemokinler gibi sitokinlerin de oluşmasını sağlarlar.

2.3. I/R Hasarı ve Güncel Literatür Çalışmaları

Akut uzun süreli arteriyel tıkanıklıklar, 15/100.000 gibi bir insidans oranıyla sık görülmelerinden dolayı ciddi klinik problemler oluşturur. Literatürdeki güncel çalışmalarda doğrudan ekstremiteki I/R hasarı sonucu, postoperatif mortalitenin %10-20 arasında postoperatif ekstremite kaybının ise %10-30 arasında olduğunu gösteren çalışmalar mevcuttur (Creager, Kaufman et al. 2012). Bu nedenle I/R hasarının hızlı ve doğru teşhisi çok önemlidir. Revaskülarizasyonun aciliyetini belirlemek için tasarlanan Rutherford sınıflaması, klinik pratikte ekstremitedeki akut iskemik hasarın şiddetinin değerlendirilmesinde yaygın olarak kullanılır (Tablo 1) (Creager, Kaufman et al. 2012).

Tablo 1. Akut ekstremite iskemisinin evreleri

Evre	Tanı ve Prognoz	Bulgular		Dopler Sinyali	
		Duyu Kaybı	Kas Zayıflığı	Arterial	Venöz
1	Ekstremite dolaşımı normal, acil cerrrahi müdahaleye gerek yok	Yok	Yok	İşitilebilir	İşitilebilir
2	Ekstremite dolaşımı tehlikede				
2a	Ekstremite dolaşımı sınırda tehlikede, uygun şekil tedavi edilirse kurtarılabilir.	Minimal (ayak parmaklarında) ya da yok	Yok	Sıklıkla işitilemez	İşitilebilir
2b	Ekstremite dolaşımı acil olarak tehlikede, acil revaskülarizasyon ile kurtarılabilir.	Birden fazla ayak parmaklarında, istirahatte ağrı ile karakterize	Hafif ya da orta	Genellikle işitilemez	İşitilebilir
3	Ekstremite dolaşımı geri dönüşümsüz şekilde bozulmuş, majör doku kaybı kalıcı sinir hasarı beklenen	Şiddetli, anestetik	Şiddetli, paralizi (rigor)	İşitilemez	İşitilemez

Klinikle ilişkili bir zaman çerçevesiyle iskemik hasar derecesinin değerlendirilmesinde hala çözülememiş sorunlar ve cevabını bekleyen sorular vardır. İskemik hasar derecesinin doğru belirlenmesi, şiddetli bir şekilde yaralanmış ekstremitenin komplikasyon oranlarını ve mortaliteyi artırması nedeniyle çok önemlidir. Ekstremitenin geri dönüşsüz hasarlandığı durumlarda, hayatı tehdit eden

komplikasyonlardan kaçınmak için ekstremitenin ampütasyonu bazen tek çözüm seçeneğidir (Turóczi, Arányi et al. 2014).

Serbest flep rekonstrüksiyonu, ekstremite revaskülarizasyonu ve nakil cerrahisi gibi bazı ameliyatlar iskelet kaslarında uzamış iskemi süresine yol açarlar.

Dolaşımın kesintiye uğraması ve yeniden tesis edilmesiyle oluşan uzun süreli sıcak iskemi süresi, dokuyu flep yetmezliği ve nekroza yatkın hale getirdiği için mikrocerrahları endişeye sokar. Flep cerrahisinde primer iskemi flep donör alanından ayrılıp anostomoz tamamlanana kadar geçen sürede oluşur. Donör alan ve damar hazırlığı flep pedikülü ayrılmadan hazırlandığında ve doğru anastomoz yapıldığında bu hasar minimum seviyede tutulabilir. Sekonder iskemi ise anostomoz sonrası pedikülün obstrüksiyona uğraması sonucu oluşur. İskemiye tolerans dokudan dokuya bağlı olarak metabolik ihtiyaçlara ve cilt, kemik, kas ve bağırsaklar sıralamasında toleransı azalacak şekilde farklılık gösterir (Gurtner, Neligan et al. 2012). Cilt ve subkutan doku göreceli olarak iskemiye daha dirençlidir ve sıcak iskemi süresinde 6 saate kadar, soğuk iskemide ise daha fazla süre canlılığını devam ettirebilir. Kas dokusu ise iskemiye karşı daha az toleransa sahiptir ve geri dönüşümsüz değişiklikler için 3 saatlik bir sıcak iskemi süresi olması yeterlidir. Bağırsak dokusu ise insan vücudunda iskemiye en az toleransı olan dokulardan birisidir (Wei and Mardini 2016). Kompozit flepler içerisinde tüm tolerans, en az toleranslı dokunun toleransına eşittir. Başarılı ve başarısız flepler arasındaki iskemi zamanlarındaki istatistiksel farkı gösteren ve 700 serbest flep kaybını içeren bir çalışma, iskemi zamanının 3 saati geçmediğinde ve no-reflow fenomeni noktasına ulaşmadığında flep başarısı ile iskemi süresi arasında anlamlı bir fark olmadığını ileri sürmüştür. Mikrocerrahi anastomozun amacı uzun bir iskemi süresinden sonra flebe akımı sağlamak ve reperfüze etmektir. Bu perfüzyon lokal ve sistemik inflamatuar yanıtlar aracılığıyla flep hasarını şiddetlendirebilir. Bu durum I/R hasarı olarak bilinir ve bunun iskemik periyod süresince serbest oksijen radikali oluşumunun sonucu olduğu düşünülür. Bu radikaller güçlü oksitleme ve indirgeme potansiyelleri aracılığıyla özellikle hücre membranlarında doku hasarına neden olur. Ayrıca nitrik oksit sentaz, prostasiklin ve trombomodulin gibi koruyucu molekülleri baskılar ve PMNL, trombosit, inflamatuar mediyatör ve sitokinleri toplayarak güçlü bir inflamatuar reaksiyonu uyarırlar. Şiddetli

I/R hasarı, geri dönüşümsüz vazokonstriksiyon ve patent anastomoz varlığına rağmen flep perfüzyonunun olmamasıyla karakterize ‘’no-reflow fenomeni’’ ile sonuçlanır (Gurtner, Neligan et al. 2012). Arteryel kan girişi bariz bir şekilde olmasına rağmen, venöz drenaj yoktur. İntraoperatif no-reflow vakalarının çoğu kötü cerrahi planlamadan dolayıdır. Alıcı damarları tam olarak hazırlamadan verici flebi hazırlamak, flep içi pedikül hasarı ya da spazmını dışlamadan önce flep perfüzyonunu kontrol etmemek, flep pedikül uzunluğunu hesaplamayıp ven grefti almaya mecbur kalmak, hastayı operasyon sırasında yeterince ısıtamamak ve bunun sonucu olarak soğuğa maruziyet, hastanın sıvı defisitinin bulunması gibi sebepler kötü cerrahi planlama örnekleridir. Bir kez no-reflow oluştuğunda intravenöz streptokinaz ya da ürokinaz uygulanması Wei ve Mardini’ ye göre flebi kurtarmak için en iyi tedavi yöntemidir (Wei and Mardini 2016). Tavşan epigastrik cilt serbest ada flebinde, serbest flep cerrahisi no-reflow fenomeni patogenezi çalışılmış, iskeminin endotelyal ve parankimal hücrelerin şişmesine, kapiller lümenin daralmasına, damar içi kan hücrelerin agregasyonuna, ödem oluşturmak için intravasküler sıvının hücreler arası kaçışına neden olduğu kanıtlanmıştır. Wei ve Mardini’ ye göre bu aşama fibrinolitik ilaçlar ya da Non-steroid antiinflamatuar ilaçların (NSAID) kullanılmasıyla tedavi edilebilir. Buna ek olarak, hastanın hiperkoagülabilite durumlarına yatkın olup olmadığı tromboza katkı sağlayan nedenler arasında göz önünde bulundurulmalıdır çünkü çok nadiren de olsa heparin-uyarılmış trombositopeni sendromunda olduğu gibi, heparin tedavisinin uygulanması paradoksik bir şekilde tromboza neden olabilir (Wei and Mardini 2016). Bu patoloji 1 saatten 8 saate kadar iskemi zamanının uzunluğuyla artar ve iskemiden 12 saat sonra kan akımı obstrüksiyonunun geri dönüşümsüz noktaya ulaşmasıyla, no-reflow ve nihai olarak flep ölümü başlar. Laboratuar hayvanı iskelet kaslarında no-reflow fenomeni gelişimiyle alakalı, ana rolü olan 3 patojenik mekanizma öne sürülmüştür:

1- Oksijen kaynaklı serbest radikallerin endotelyal ve parankimal hücrelerde hasara neden olması
2- Hücre membran hasarının Ca^{+2} akışına izin vermesi ve interselüler aşırı Ca^{+2} yüklenmesi
3- AA metabolizmasındaki değişiklik sonucu endotelden vazodilatasyon ve antitrombotik bir molekül olan Prostoglandin I_2 (PGI_2)’ nin daha az

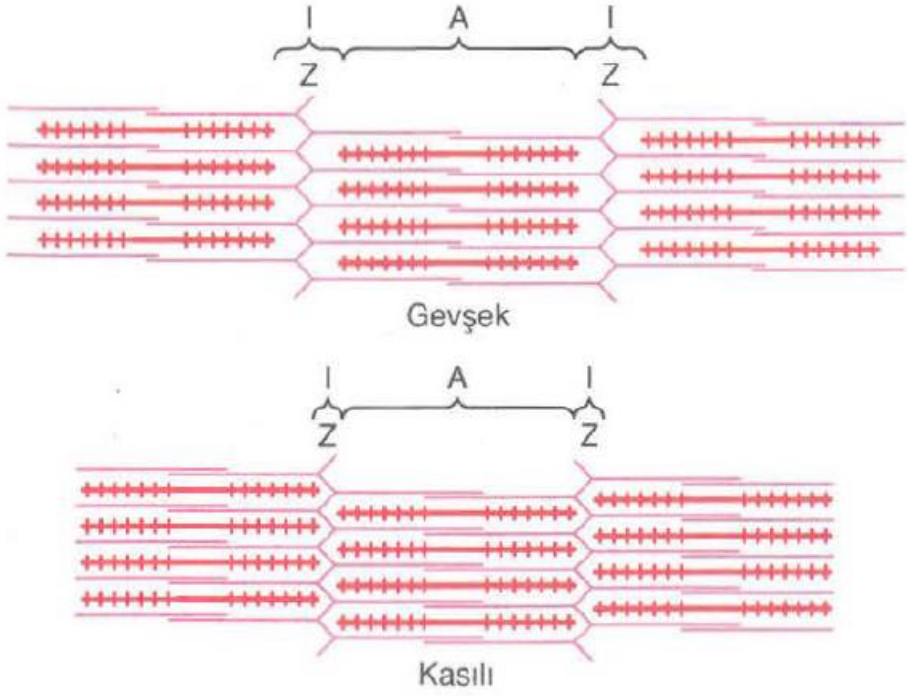
sentezlenmesi, vazokonstrüktif ve trombotik özellikleri olan Tromboksan A_2 (TXA_2)' nin de artmış sentezi

Bu fenomen, iskemi-uyarılmış endotel hasarının bir sonucudur ve hücresel şişme, subendotelyal kollajenlerin açığa çıkması, trombosit-lökosit agregasyonu ve kan akımında azalmaya yol açar. Bu durumun düzeltilememesi ise tromboz ve flep kaybıyla sonuçlanır (Gurtner, Neligan et al. 2012).

Ekstremiteye dolaşımın sağlanması sonrası oluşan reperfüzyon sendromunun reperfüzyon sonrası oluşan lokal cevap, çoklu organ yetmezliği ve ölümle sonuçlanan sistemik cevap olmak üzere klinik olarak iki ana bileşeni mevcuttur (Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). I/R hasarı, sadece lokalize bir hasar olmayıp, iskelet kası, kalp, akciğer (AC), böbrekler, santral sinir sistemi gibi multipl doku ve organda hasar oluşturabilmektedir. I/R hasarının daha fazla ilerlemesi dissemine intravasküler koagülasyon ve multipl organ yetmezliği (MOY) sonucu hayatı tehdit edebilir (Dick, Li et al. 2008). Bu hasar ilerlediğinde, replante ekstremiteler problemlerin üstesinden gelebilmek için, hastanın hayati riski de göz önüne alınarak reampute edilebilir (Khalil, Aziz et al. 2006).

İskelet kasları vücut kütlesinin yaklaşık olarak %40 ını oluştururlar. Bütün iskelet kasları, çapı 10-80 mikrometre arasında değişen çok sayıda liften oluşmuştur ve her kas lifi birkaç yüz ile birkaç bin arasında myofibril içerir. Her miyofibril kas kasılmasından sorumlu büyük polimerize proteinler olan yanyana yaklaşık 1500 miyozin iplikçiği ve 3000 aktin iplikçiğinden oluşmuştur. Bunlar kas kasılmasından sorumlu olan büyük polimerize proteinlerdir. Kas kasılması ‘’kayan iplikçikler’’ mekanizmasıyla oluşur. Bu mekanizma miyozin iplikçiklerinin çapraz köprüleri ile aktin iplikçiklerinin etkileşimi sonucu oluşan kuvvet esasına dayanır. İstirahat koşullarında bu güç inaktiftir. Ancak bir aksiyon potansiyelinin kas lifinin zarında yayılması sarkoplazmik retikulumdaki Ca^{+2}' nin hızla miyofibrillere serbestlenmesine neden olur. Bu Ca^{+2} iyonları miyozinle aktin iplikçikleri arasındaki güçleri aktive eder ve kasılma başlar (Şekil 11), (Hall 2015). Fakat kasılma işleminin gerekleşebilmesi için enerji de gerekir. Bu enerji ATP' nin yüksek enerjili fosfat bağlarından elde edilir; bu sırada gerekli enerjiyi serbestlemek üzere ATP,

Adenozin difosfat (ADP)' a dönüşür. Kas tarafından yapılan iş ne kadar büyükse, yıkılan ATP miktarı da o kadar fazladır ve buna ''Fenn etkisi'' denir. Kasın kasılması için gerekli enerjinin çoğu çapraz köprülerin aktin iplikçiklerini çektiği boyunca-yürüme mekanizmasını gerçekleştirmek için kullanılır; fakat az miktarı kasılmadan sonra Ca^{+2}' yi sarkoplazmadan sarkoplazmik retikuluma pompalamak ve kas lifinde aksiyon potansiyelinin yayılması için uygun iyon ortamını devam ettirmek üzere kas lifi zarında Na^{+} ve K^{+} iyonlarını pompalamak için kullanılır.



Şekil 11. Bir miyofibrilin gevşek ve kasılı durumları (üstte) Aktin filamentinin (pembe) miyozin filamentlerinin (kırmızı) arasındaki boşluklara kayması ve Z disklerini birbirine doğru çekmesi (altta)

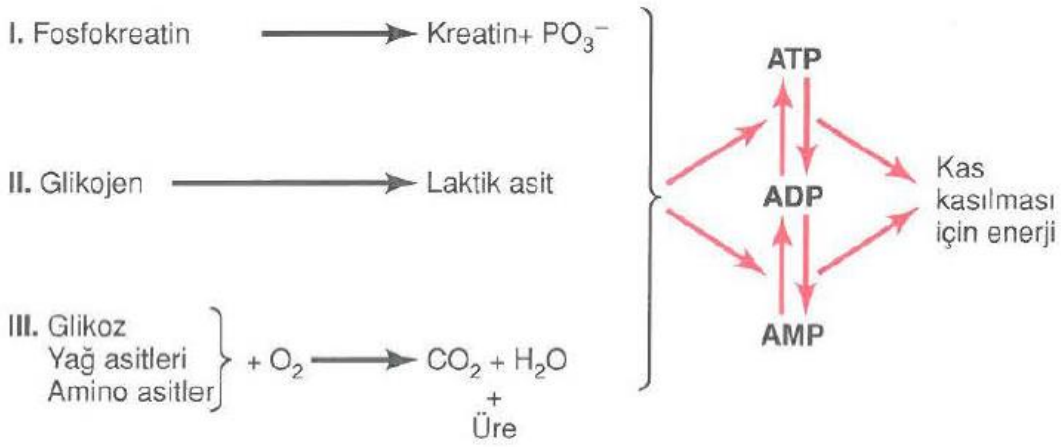
Kas lifinde mevcut olan yaklaşık 4 milimolarlık ATP konsantrasyonu, tam kasılmayı ancak 1-2 saniye sürdürebilir. ATP, ADP'ye ayrılarak kas lifinin kasılmasıyla ilgili birimlerine enerjiyi aktarır. Kasın kasılmasının sürdürülmesi için, ADP saniyeden daha kısa bir sürede yeni ATP oluşturmak üzere yeniden fosforile edilir. Bu yeniden fosforilasyon için üç enerji kaynağı vardır.

ATP yi yeniden oluşturmak için kullanılan ilk enerji kaynağı ATP' dekine benzer bir yüksek enerjili fosfat bağı taşıyan fosfokreatindir. Fosfokreatinin yüksek enerjili fosfat bağı, ATP ' dekinden biraz fazla miktarda serbest enerjiye sahiptir. Fosfokreatinin yıkılması ile açığı çıkan enerji, yeni bir ATP oluşturmak üzere bir fosfat iyonunun ADP'ye bağlanmasını sağlar. Bununla birlikte, kas lifinde toplam fosfokreatin miktarı az olup ATP' nin ancak beş katı kadardır. Dolayısıyla, kasta depolanmış ATP ve fosfokreatinin toplam enerjisi, maksimum derecede kas kasılmasını sadece 5-8 saniye sürdürebilir.

ATP ve fosfokreatini yeniden oluşturmak için kullanılan ikinci önemli enerji kaynağı, kas hücrelerinde depolanmış glikojenin glikolizidir. Glikojenin pirüvik asit ve laktik aside hızlı yıkımı sonucu açığa çıkan enerji ADP' yi ATP' ye dönüştürür. ATP daha sonra kas kasılmasına enerji temin etmek veya fosfokreatin depolarını yeniden oluşturmak için kullanılır.

Bu glikoliz mekanizması iki açıdan önemlidir. Birincisi, glikolitik reaksiyonlar oksijen olmasa da meydana gelir; dolayısıyla oksijen sağlanamadığı zaman da kas kasılması saniyeler ve bazen de dakikadan daha uzun süre devam ettirilebilir. İkincisi, glikolitik işlemle ATP oluşma hızı, hücresel besinlerin oksijenle reaksiyona girmesi sonucu oluşan ATP' nin yapım hızından yaklaşık 2,5 kat fazladır. Ancak, kas hücresinde çok fazla glikoliz ürünü birikmesi nedeniyle, glikoz tek başına kas kasılmasını yaklaşık 1 dakika kadar sürdürebilir.

Üçüncü ve son enerji kaynağı oksidatif mekanizmadır. Bu, oksijenin glikoliz son ürünleri ve çeşitli hücresel besin maddeleri ile reaksiyona girerek ATP oluşturması demektir. Kas tarafından uzun süreli kasılmada kullanılan enerjinin %95' inden fazlası bu kaynaktan elde edilir. Kullanılan besin maddeleri, karbonhidratlar, yağlar ve proteinlerdir. Çok uzun süreli maksimum derecede kas aktivitesinde enerjinin büyük kısmı yağlardan elde edilir. Ancak 2-4 saat süren kas aktivitesi için enerjinin en az yarısı depolanmış karbonhidratlardan gelir (Hall 2015), (Şekil 12), (Hall 2015).



Şekil 12. Kas kontraksiyonu için enerji sağlayan önemli metabolik sistemler

Metabolik olarak bu kadar aktif ve ATP ihtiyacı bu kadar fazla olan bir dokuya eksternal ya da internal bir sebepten dolayı oksijen sunulamaması iskemiye uğramasına neden olur. İskemi ise iskelet kası hücrelerinin mitokondriyal oksidatif fosforilasyonunun bozulmasına sebep olur. Hücreler enerji temin mekanizmalarını, aerobik solunumdan anaerobik solunuma çevirerek laktik asit üretmeye başlarlar. İlerleyici iskemi enerji açısından zengin ATP' nin tükenmesine ve hücre dışı Ca^{+2} iyonunun kas hücreleri içine sızmasına neden olur. Nihai sonuç ise disfonksiyon ve nekroz ya da apoptoz yoluyla hücre ölümüne neden olur (Santistevan 2017).

Reperfüzyon hasarı, iskemik ekstremiteye kan akışı yeniden sağlandığında oluşur. Ekstremitedeki iskemik kas hücreleri serbest oksijen radikali üretmeye başlar. Açığa çıkan serbest oksijen radikalleri ise membran lipidlerinin peroksidasyonunu tetikler. Kapiller geçirgenliğin ve filtrasyonun artması ise kompartman sendromuyla ilişkili ödeme yol açar. İnflamasyon sonuçları ve lökosit-aktive trombositler, trombosit agregasyonuna ve kompleman sisteminin aktivasyonuna yol açar. Nihai sonuç ise daha önce de anlatıldığı gibi no-reflow fenomeni olarak adlandırılan reperfüze damarların tıkanması ile sonuçlanır. K^+, fosfat, myoglobin, Kreatin Kinaz (CK), tromboplastin gibi hücre ölümünün yan ürünleri sistemik dolaşıma katılır ve oluşan hiperkalemi, hiperfosfatemi, metabolik asidoz ve myglobinemi tablosu rabdomyoliz, kardiyak

disritmi, çoklu organ yetmezliği, dissemine intravasküler koagülasyon ve ölüme yol açabilir (Souza Júnior, Moreira Neto et al. 2013, Santistevan 2017).

Alt ekstremitede oluşan I/R sendromu, pulmoner mikrodolaşımda PMNL sekestrasyonu, artmış endotelyal permeabilite ve intersitsyel ödem oluşmasıyla AC hasarı oluşturur. İskemik hasar organlara ulaşan kan akımının azalmasıyla, reperfüzyon hasarı ise serbest oksijen radikali üretiminin artmasıyla sonuçlanır (Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). Reaktif oksijen radikalleri ve özellikle başta TNF-α olmak üzere sitokinlerin etkisiyle AC disfonksiyonu başlar. Bu hasarın ilerlemesi ise kapiller sızma ve pulmoner ödemin artmasıyla AC yetmezliğine kadar uzanan bir kliniğe neden olabilir.

Başlangıçta revaskülarize edilen geniş doku kütlelerinin neden olduğu bu hasar, metabolik asidoz, intraselüler K^+ kaybı sonucu hiperkalemi, serum CK ve myoglobin markerlarında artış, myoglobinüri, ve dissemine intravasküler koagülasyon ile sonuçlanabilir (Dick, Li et al. 2008). Reperfüzyon sonrası oluşan bu asidik ortamda renal tübüllerde myoglobin çökelmesi sonucu akut tübüler nekroz oluşur (Cunha, da Silva et al. 2005, Souza Júnior, Moreira Neto et al. 2013). Kliniğin daha da ilerlemesi renal damarlarda obstruksiyon ve hipotansiyon yoluyla myoglobinürik akut böbrek yetmezliğine yol açabilir. Ekstremite revaskülarizasyon cerrahisi geçiren hastalarda, beklenildiği gibi arteriyel oklüzyonun ciddiyeti ile böbrek yetmezliği arasında güçlü bir korelasyon vardır (Khalil, Aziz et al. 2006).

Yüksek enerjili travma ya da amputasyon sonrası ekstremitelerin replantasyonu her zaman başarılı olmayabilir ve başarı için en önemli faktör iskeminin başlangıcından sonra geçen süredir. Replante edilen dokunun canlılık ve nihai fonksiyonelliği anoksinin zararlı etkilerinin önlenmesine bağlıdır. Anoksiye direnç dokular arasında farklılık gösterir. İskelet kasları iskemiye en az toleransa sahip olan dokulardan birisidir. İskelet kasında hücre hasarı için sadece 30 dakikalık bir iskemi süresi yeterli iken, geri dönüşümsüz değişiklikler 4-6 saat arasında oluşur. Ancak histokimyasal incelemelerde, 2 saat kadar şiddetli iskemi süresinin olması değişikliklerin ayırt edilebilmesi için yeterlidir (Mäkitie and Teräväinen 1977). Kas dokusunun canlılığının sürdürülebilmesi başarılı bir replantasyon için çok kritiktir (Cunha, da Silva et al. 2005, Souza Júnior,

Moreira Neto et al. 2013). Ekstremitelerde oluşan akut I/R hasarında, iskelet kasları özel bir öneme sahiptir. İskelet kaslarında gelişen I/R hasarı, ödem, mikrovasküler perfüzyon açığı, kas hasarı ve kas fonksiyon kaybına neden olur (Bihari, Cepinskas et al. 2017).

I/R hasarı ekstremite transplantasyonlarında da kritik öneme sahiptir. I/R hasarı, immünolojik yanıtı artıran non-immunolojik nedenlerden birisidir. I/R hasarı sadece erken-gecikmiş greft rejeksiyonuna değil, aynı zamanda geç allogreft disfonksiyonuna da katkıda bulunan kronik allogreft vaskülopati nedenlerinden birisidir. Total allogreft iskemi süresi, donör alandan allogreft alınmadan önce ya da alındığı esnadaki sıcak iskemi süresi ve alındıktan sonra organın korunması, daha sonra organın revaskülerize edilmesiyle ilgili soğuk iskemi süresini içerir. Organın çıkarılması, saklanması ve yerleştirilmesi ile ilişkili faktörler, Major Doku uyumu Komplekslerinin (MHC) aşırı uyarılması ve kompleman yolağı aktivasyonuyla lökosit infiltrasyonu ve nihayetinde obliteratif vaskülopati ve fibrozise yol açarak allogreft immunojenitesini artırabilir (Wei and Mardini 2016).

Ekstremitenin yaşayabilirliğini artırma çabaları yazarların farklı modeller üzerinde iskemik ekstremite perfüzyonunu ve farklı ilaçlar üzerinde ekstremite yaşam oranlarını artıracak çalışmalara yönelmesine sebep olmuştur. İskelet kasları hakkında yapılan morfolojik çalışmalarda birçok iskemi reperfüzyon modeli tanımlanmıştır (Carmo-Araújo, Dal-Pai-Silva et al. 2007). Köpek gracilis kası, köpek alt ekstremite kasları, sıçan kremaster kası, sıçan izole alt ekstremite kasları ve turnike modeli uygulanarak sıçan alt ekstremite kasları üzerine iskemi oluşturan farklı modeller tanımlanmıştır (Strock and Majno 1969, Diana and Laughlin 1974, Kuzon, Walker et al. 1986, Suval, Durán et al. 1987, Beyersdorf, Matheis et al. 1989). I/R' dan sonra kas dokusunda patolojik lezyonların oluşmasına kas tipi, I/R süresi ve travma oluşturma yöntemi gibi birkaç faktör katkıda bulunur (Carmo-Araújo, Dal-Pai-Silva et al. 2007).

Kas hasarı oranı, geri dönüşümsüz değişikliklerin oluştuğu noktaya kadar iskemi zamanıyla birlikte artar. Bu nokta kasın iskemiye toleransı olarak adlandırılır. Paradoksal olarak ilave komplikasyonlar da reperfüzyon sırasında ortaya çıkar. Bir dokunun iskemik toleransı esasen rezidüel kollateral dolaşımın olup olmamasına bağlıdır (Rosero, Németh

et al. 2014). Literatürde iskemik kas hasarını simüle eden birçok sıçan modeli tanımlanmıştır. Ekstremite etrafına turnike sarılması, infrarenal aortun klempe edilmesi, iliac arterin klempe edilmesi, femoral arterin klempe edilmesi şeklinde birçok model tanımlanmıştır (Küntscher, Schirmbeck et al. 2002, Koksal, Bozkurt et al. 2004, Dillon, Laing et al. 2006, Goksin, Adali et al. 2011). Turnike uygulanması, kan akımının tamamen kesildiği ve tam bir iskeminin sağlanabildiği kanıtlanmış tek modeldir (Barie and Mullins 1988). Diğer tüm teknikler oklüzyon tekniğine bağlı olarak arta kalan farklı derecelerde rezidüel akım bıraktığı için büyük kas kitlelerine olan kan akımını durduramazlar.

Geleneksel cerrahi akıla uyum sağlamak ve iskemi zamanını düşürmek için dokuların uğradığı travmayı minimum seviyede tutmak daha az bir I/R hasarı için önemlidir. Ancak birçok klinik durumda, cerrahın kontrolü ve diğer ölçümler ötesinde iskemi süresi, reperfüzyon hasarının genişliğinin minimum seviyede kalması için gereklidir (Khalil, Aziz et al. 2006).

I/R hasarının neden olduğu komplikasyonların farkına varılmasına rağmen, iskemi-reperfüzyon hasarının kompleks patofizyolojik mekanizması ve potansiyel tedavi edici ajanların yetersiz kalması, iskemi-reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik cerrahi ve farmakolojik teknikler üzerine araştırmaların güncelliğini korumasına yol açmıştır.

2.3.1. I/R Hasarı Tedavisinde Kullanılan Cerrahi Yöntemler

I/R hasarını önleme ve tedavi etmeye yönelik olan girişimsel işlemlerden biri hipotermi ve arter içi yıkamadır. Hipotermi, reperfüzyon sonrası doku içine olan PMNL infiltrasyon miktarını azaltır ve bunun sonucunda da daha az ROT üretilmiş olur. Hipotermiye hızlı bir şekilde başlanması ve hipoterminin devam ettirilmesi ampute uzuvların soğuk iskemi süresini uzatır ve ekstremitelerin replantasyon başarısını da artırır. Lokal hipoterminin doku canlılığını artırabildiği çeşitli hayvan modellerinde gösterilmiştir. Arter içi infüzyon ya da yıkama I/R hasarını azaltmak için kullanılan bir diğer tedavi yöntemidir. Tek başına ya da kombinasyon halinde birçok solüsyon ve farmakolojik ajan kullanılabilir. University of Wisconsin (UW) ve Euro-Collins

solüsyonu en fazla araştırma konusu olan solüsyonlardır (Khalil, Aziz et al. 2006). Bschorer ve arkadaşları yaygın olarak kullanılan üç doku koruyucu sıvıları karşılaştırmış ve UW solüsyonunun insanlardaki serbest flep çalışmalarında optimal endotelyal korumayı sağladığını bildirmişlerdir (Bschorer, Blake et al. 1997). Ayrıca literatürde I/R hasarına karşı mücadele etmek için UW solüsyonlarına Lazaroid gibi lipid peroksidasyon inhibitörleri, ROT kurtarıcıları, pirolidin gibi antiinflamatuar düzenleyiciler ve NO donörü moleküller eklenmesinin yararlı olduğuna dair çalışmalar mevcuttur (Aeba, Killinger et al. 1992, Gu, Xu et al. 2004). Lokal hipotermi, muskulokutan flepleri 96 saate kadar yaşatabilir ve buzlu modifiye Collins solüsyonuyla intrarteryel yıkama yapıldığında bu süre daha da uzayabilir (Tsai, Jupiter et al. 1982). Ancak bu tedavi yöntemi, sadece kas flepleri için uygulanabilir ve cilt komponenti içeren miyokutan, fasiyokutan ya da perforatör flepler için uygun bir tedavi yöntemi değildir. Ciltteki kan damarları termal homeostazise sahiptir ve sıcaklık değerlerindeki azalma cilt perfüzyonunun da azalmasına yol açar. Canlı yaşayan bir vücutta bu tip fleplere (özellikle fasiyokutan flepler) lokal hipotermi uygulamak kan akımını ve postokluzif hiperemiyi azaltır ve tekrar ısıtma gerçekleştirilemezse iskemik flep komplikasyonlarının artışına yol açar. Lokal hipoterminin 4 santigrad derece(^{o}C) düzeylerinde olması cerrahiden önce ampute ekstremitelerin ve parmakların taşınması için idealdir. Fakat soğuk ortamda muhafaza edilen iskelet kasları da soğuk I/R hasarına duyarlıdır ve perfüzyondan önce UW solüsyonu gibi doku koruma solüsyonlarıyla iskelet kaslarının viabilitesi artırılabilir (Wagh, Pantazi et al. 2000). Ampute ekstremiteler için soğuk solüsyonlarla arter içi yıkamanın sıcaklıkta daha düzgün bir azalma sağladığı hayvan deneylerinde kanıtlanmıştır (Rosen, Slivjak et al. 1987). Bu transplantasyondan önce organ yıkanması için modifiye UW solüsyonlarının kullanılması mevcut pratiğiyle uyumludur. Ampute parmakların arter içi yıkanması dijital artere hasar verilebileceği için tavsiye edilmez; fakat ameliyat mikroskopu altında intimal temas olmadan bu işlem uygulanabilir. Elektif cerrahi olarak herhangi bir flebi arter içi yıkamak standart klinik bir prosedür değildir. Hayvan modellerinde normal salin, ringer laktat solüsyonu ya da UW solüsyonuyla preiskemik intraarteriyel yıkama, eğer iskemi zamanı içerisinde reanastomoz var ise, reperfüzyon esnasında flep viabilitesine zararlı olduğu için tavsiye edilmez (Calhoun, Tan et al. 1999, Alper, Ozek et al. 2002). Ancak reanastomoz yapılması planlanırsa, flebin dolum ve transportu için geçen iskemi zamanı haricinde (özellikle kas fleplerinde) işlem

öncesi lokal hipotermi ve doku koruma solüsyonlarıyla yıkama uygulaması flep viabilitesini önemli ölçüde artırabilir (Wagh, Pantazi et al. 2000). Arter içi yıkamanın flep kaybının tedavi edilmesinde önemli derecede yararları olduğu gösterilmiştir. Fizyolojik solüsyonlara superoksit dismutaz gibi bir serbest radikal kurtarıcısı eklenmesi ya da superoksit dismutaz gibi bir serbest radikal kurtarıcısı ve ürokinaz, streptokinaz gibi bir trombolitik ajan ve heparin, Prostoglandin E_1 (PGE_1) gibi antitrombotik bir ajanın kombine edilmesi hem hayvan deneylerinde hem de klinik olarak insanlar üzerinde başarıyla kullanılabilir (Schubert, Hunter et al. 1987, Shah, Zhang et al. 1996, Wechselberger, Schoeller et al. 1998, Hataya, Matsuo et al. 1999).

Son 20 yılda kalp ve iskelet kası I/R hasarı alanındaki çalışmalar, I/R hasarını önleme ve tedavi etmeye yönelik girişimsel işlemlerden bir diğeri olan preiskemik ve postiskemik koşullandırma üzerine odaklanmıştır. Bu bilgi önemlidir; çünkü serbest flep ve replantasyon cerrahisinde, iskelet kasları ve cildin I/R hasarından korunması ya da bu hasarın önlenmesi yeni ilaçların bulunmasına öncülük edebilir. Uzun bir iskemi süresinden önce tekrarlayan kısa periyodlar halinde iskemi ve reperfüzyon, reperfüzyon hasarının yayılımını azaltabilir. İskemik koşullandırmanın etkisi bifaziktir. Erken faz olan ilk 24 saatte birkaç tetikleyici vardır; fakat en önemlisi Protein kinaz C aktivasyonu sonucu açığa çıkan adenozindir. Geç faz yani 72 saate kadar olan süre ise endotoksinler, NO, adenozin agonistleri, opioid agonistleri ve TNF-α gibi geniş kapsamlı tetikleyici mediyatörleri içerir. Uyarılabilir NOS ve COX-2 geç koşullandırmanın açığa çıkan ana mediyatörlerindendir. İskemik koşullandırmanın koruyucu etkisi I/R döngüsü süresi ve sayısına bağlıdır (Khalil, Aziz et al. 2006). Zahir ve arkadaşları 10 dakikalık döngünün, 5 dakikalık döngüye ve üç defa döngünün ise bir veya iki adet döngüye göre daha üstün olduğunu göstermişlerdir (Zahir, Syed et al. 1998). İskemik koşullandırmanın flepler üzerine etkinliği, birçok hayvan modelinde tanımlanmıştır. Restifo ve Thomson 1998' de pediküllü transversus rectus abdominis muskulokutan flebinde akut iskemik koşullandırmadan sonra iyi sonuçlar alındığını belirttiler (Restifo and Thomson 1998). Cheng ve arkadaşları ise 1999 yılında ciddi el yaralanması olan 12 hastanın üzerinde, pedüküllü groin fleplerde iskemik koşullandırmanın etkinliğini çalıştılar. Bu çalışmanın sonucuna göre doppler ölçümlerinin kullanıldığı değerlendirmelerden sonra 8.4 günlük bir periyodda ve %90 başarı oranıyla erken pedikül ayrılmasının mümkün olduğunu ileri

sürdüler (Cheng, Chen et al. 1999). İskemik koşullandırmanın koruyucu etkileri uzak organlara genişletilebilir. Örneğin, geçici iskemi insan kalbinde reperfüzyon-indüklenmiş endotel disfonksiyonunu azaltabilir (Kharbanda, Mortensen et al. 2002). Bu koruyucu etki prostoglandin ve kalsiyum gen-ilişkili peptid salgılanması aracılığıyla olduğu düşünülmektedir. Uzak iskemik koşullandırma deney hayvanı modellerinde flep canlılığını da sağlayabilir. Sıçanlarda alt ekstremiteye 10 dakikalık iskemi ve 30 dakikalık reperfüzyon döngüleri uygulandığında epigastrik flep canlılığının arttığını ileri süren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Küntscher, Schirmbeck et al. 2002). Preiskemik ve postiskemik koşullandırmanın mekanizmasını anlamak, preiskemik ve postiskemik koşullandırmayı taklit eden farmakolojik tedavi yöntemlerinin identifikasyonuna yeni bir bakış açısı sağlayabilir.

I/R hasarını önleme ve tedavi etmeye yönelik olan girişimsel işlemlerden sonuncusu ise anjiyogenezi uyararak flep yaşamsallığını artıran cerrahi geciktirmedir. Cerrahi geciktirme özelikle yüksek riskli hastalarda flep cerrahisinde standart bir klinik uygulamadır. Zahir ve arkadaşları iskemik koşullandırma ve cerrahi geciktirmenin muskulokutan fleplerin yaşamsallığını değerlendirmede benzer yararları olduğunu bulmuşlardır (Zahir, Syed et al. 1998). Transversus rectus abdominis muskulokutan flebinde selektif derin inferior epigastrik arter embolizasyonu etkinliğinin değerlendirildiği bir çalışmada Scheufler ve arkadaşları cerrahi geciktirme yapılan 40 hastada embolizasyon ve cerrahi arasındaki sürenin 3 aydan biraz fazla olduğunu ve çalışmanın sonucunda da herhangi bir flep kaybı yaşamadıklarını bildirmişlerdir (Scheufler, Andresen et al. 2000). Cerrahi ve vasküler geciktirme, cilt ve kas flebi başarısını artırmak için kanıtlanmış olan tek klinik tekniktir; ancak bu cerrahi manipülasyonlar zaman alıcı ve maliyetlidir. Benzer şekilde preiskemik ve postiskemik koşullandırma da serbest flep cerrahisi yapılan laboratuar hayvanlarındaki I/R hasarını önlemekte oldukça etkilidir; fakat cerrahlar serbest flep cerrahisindeki I/R hasarına karşı iskemik koşullandırma klinik testelerine öncülük etmekte mesafelidirler çünkü bu teknikler zaman alıcı ve invazivdir. Eksta cerrahi prosedür ihtiyacı cerrahi geciktirmenin majör dezavantajı iken, iskemik koşullandırma flep elevasyonu sırasında yapılabilir. Bu yüzden cilt ve kas kan akımını ve pedikülüllü fleplerdeki distal perfüzyonu artırmak, serbest flep ve replantasyon cerrahisindeki cilt ve kas dokusunu I/R hasarından korumak

için farmakolojik tedavi ajanlarını araştırmaya devam etme ihtiyacı vardır (Gurtner, Neligan et al. 2012).

2.3.2. I/R Hasarı Tedavisinde Kullanılan Farmakolojik Yöntemler

Vazospazm, tromboz ve I/R hasarı serbest flep ve replantasyon başarısızlığındaki üç ana sebeptir. Günümüzde flep cerrahinde vazospazm ve trombozu önlemek ya da tedavi etmek için nispeten güvenli ilaçlar mevcuttur; fakat I/R hasarı için ilaç tedavisi hala deneysel araştırma konusu olmaya devam etmektedir. İlaç tedavisi bazı cerrahlar tarafından serbest flep cerrahisinde anastomotik vazospazm ve trombozu önlemek veya tedavi etmek için kullanılabilir. Bu ilaçlar doz, etkinlik ve tedavi rehberlerine göre üç kategoride sınıflandırılabilir:

1- Antikoagülan ajanlar: Heparin, aspirin ve dextran mikrocerrahide yaygın olarak kullanılan üç antikoagülandır; fakat etkinlikleri belirsizliğini korumaktadır.
2- Trombolitik ajanlar: Streptokinaz ve Rekombinant doku plazminojen aktivatörü (rt-PA) serbest fleplerde klinik olarak başarılı şekilde yaygın olarak kullanılan trombolitik ajanlardır.
3- Antispazmodik ajanlar: Papaverin, nifedipin ve lidokain klinik mikrocerrahide kullanılan yaygın topikal antispazmodik ajanlardandır (Gurtner, Neligan et al. 2012).

I/R hasarını önleme ve tedavi yönelik kullanılan çok sayıda farmakolojik ajan ve molekül mevcuttur. Bunları kabaca gruplarsak şu şekilde özetleyebiliriz:

2.3.2.1. Antitrombotik Ajanlar

Heparin, aspirin ve dextran bu grubun majör ilaçlarıdır. Heparinin rutin olarak replantasyon sonrası ve kurtarılması şüpheli olan fleplerde kullanılmasının nedeni antitrombotik özelliğinden dolayıdır. Heparin üç önemli antiinflamatuar etkiye sahiptir. Bunlardan birincisi heparinin P ve L Selektin moleküllerine bağlanarak, lökositlerin kandan dokuya geçişini azaltmasıdır. İkincisi heparin Nükleer faktör kappa B gibi maddeleri aracılığıyla proinflamatuar transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonunu inhibe ederek, inflamatuar kaskadı bozar. Son olarak da lökositlerden ROT üretimini azaltır (Khalil, Aziz et al. 2006). Heparinin farklı hayvan modellerinde fleplerin surveyini artırdığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Maeda, Fukui et al. 1991, Li, Cooley et al. 1995). Heparin aynı zamanda postkapiller venüllerdeki lökosit-endotel etkileşimini, platelet agregasyonunu ve mikrotrombüs formasyonunu azalatarak no-reflow fenomeninin oluşmasını da azaltabilir. Venöz anostomozların selektif heparinizasyonunun çalışıldığı 28 hastalık bir klinik çalışmada, heparinin latissimus dorsi serbest myokutan flebinin venöz patensi ve surveyi üzerine önemli derecede yararları olduğu gösterilmiştir (Labosky 1991). Heparin (100-200 IU/kg/gün) ve PGE_1 (5 µg/gün) kombine arter içi tedavisinin yüksek riskli 16 hastanın 15 inde flep surveyini sağladığı bildirilmiştir (Matsuo, Kushima et al. 1992). Flep sonuçlarının araştırıldığı 493 serbest flep çalışması içeren prospektif bir çalışmada, subkutan heparin uygulamasının postoperatif tromboz insidansını önemli ölçüde azalttığı belirtilmiştir (Khouri, Cooley et al. 1998). Bununla birlikte literatürde heparinin postoperatif olarak aspirin ve dextran 40 gibi diğer antitrombotik ajanlarla birlikte kullanıldığında komplikasyon oranlarının arttığını söyleyen çalışmalar da mevcuttur (Pugh, Dennis et al. 1996). Düşük doz heparin uygulamasının (2000-3000 IU bolus daha sonra 100-400 IU/saat), intraoperatif kanama ya da hematom komplikasyon riski olmadan dextran 40 (25ml/saat) ve yüksek doz heparin uygulaması kadar etkili olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Kroll, Miller et al. 1995). Farklı bir çalışma da mikrovasküler cerrahi anastomoz sırasında lümen içi irrigasyon solüsyonu olarak anti trombotik bir ajan olan Rekombinant insan doku faktör yolağı inhibitörünün kullanılmasının heparin kadar güvenli, etkili ve tolere edilebilir olduğu gözlenmiştir (Khouri, Sherman et al. 2001).

2.3.2.2. Trombolitik Ajanlar

Fibrinolitik ilaçlar, mikrocerrahide anastomoz trombozunu önleme amaçlı proflaktik olarak kullanılmaktadır. Yamano ve ayrıca Fukui&Tamai ürokinaz, heparin ve PGE_1' i replantasyon protokolünün bir bölümü olarak kullanmışlardır (Fukui and Tamai 1994) (Yamano 1993). Vertos&Tsavissis streptokinaz ve düşük molekül ağırlıklı dextranı replantasyonlardan sonra rutin olarak kullanmıştır (Vretos and Tsavissis 1995). Fibrinolitik ilaçlar iskemik hasarın etkilerini azaltmak için terapötik olarak kullanılabilir. Akut koroner arteryel tromboz, derin venöz tromboz ve pulmoner tromboembolizm gibi klinikteki çeşitli trombotik patolojilerin tedavisinde etkinliği gösterilmiştir. Mikrocerrahi fleplerin ve replantasyonların canlılığının devamında trombolitik ajanların rolü henüz tam olarak kanıtlanmamıştır. Çok sayıda ilaç tartışmalı sonuçlarla test edilmektedir. Yakın zamanda streptokinaz ve rt-PA replantasyon ve deneysel tromboz modellerinde başarıyla kullanılmıştır (Cunha, da Silva et al. 2005).

2.3.2.3. Serbest Radikal Kurtarıcıları, Vazodilatör ve Antiinflamatuar Ajanlar

ROT' lara karşı hücresel savunma mekanizmalarından biri enzimatik kısım diye temsil edilen SOD, katalaz ve glutatyon peroksidaz gibi serbest radikal kurtarıcısı olan enzimlerdir. Non-enzimatik kısım olarak adlandırılan diğer mekanizma ise oldukça destrüktif olan serbest radikal türlerini kurtararak, oksidatif hasarı inhibe edebilen çok sayıda doğal veya sentetik antioksidan maddeleri içerir (Bolcal, Yildirim et al. 2007). Deneysel hayvan modelleri üzerinde serbest radikal kurtarıcılarının kullanıldığı çalışmalar liteatürde mevcuttur. Rekombinant insan-sığır SOD enzimi böbrek nakilli hastaların tedavisinde kullanılmıştır. Siklosiporinle tedavi edilmiş bir renal kadavra allogreft alıcısına, operasyondan önce 200 mg süperoksit dismutaz intravenöz olarak enjekte edilmiş ve sadece siklosporin ile tedavi edilenlere göre daha az akut rejeksiyon geliştiği görülmüştür (Land, Schneeberger et al. 1994). SOD' un fleplerde klinik değeri henüz kanıtlanmamış, fakat deney hayvanlarında paranteral yoldan verilmesinin muskulokutan ve iskelet kası fleplerinde tedavi sonucunu iyileştirdiği gösterilmiştir (Prada, Arrunategui et al. 2002).

Vitamin A, C ve E antioksidan özellikleri olan mikrobesinlerdir. Bu ürünler tek başlarına radikal kurtarıcıları kadar etkili değildir; fakat diğer vitamin ve farmakolojik ajanlarla kombine edildiğinde, reperfüzyon hasarını azaltmakta sinerjistik etki gösterirler. Örneğin deney hayvanlarında Vitamin A ve E birlikte kullanıldığında lipid peroksidasyonunu azaltmış, yaşayan flep alanını artırmıştır (Bilgin-Karabulut, Ademoğlu et al. 2001). Vitamin E, prostasiklinlerin stabil bir formu olan ilioprost ile kombine edildiğinde, lipid peroksidasyonunu azaltarak iskelet kaslarındaki reperfüzyon hasarını hafifletebilmiştir (Bozkurt 2002).

Bir diğer antioksidan ajan olan allopürinol, ROT' ların oluşmasını azaltan bir ksantin oksidaz inhibitörüdür. Ksantin oksidaz varlığı türler arasında ve spesifik türlerin de çeşitli dokuları arasında farklılık gösterir. Örneğin, sıçan cildinde enzimin aktivitesi, domuz ve insanlarla karşılaştırıldığında 40 kat fazladır (Picard-Ami, MacKay et al. 1991). Buna ilave olarak ksantin oksidaz aktivitesi insan cildinde iskemi süresince etkilenmezken, insan kaslarında normotermik iskemi esnasında enzimin aktivitesinde bir artış vardır (Wilkins, Rees et al. 1993). Allopürinol flep I/R hasarı tedavisinde başarısız iken, 60 hastanın reimplante başparmaklarının değerlendirildiği bir klinik çalışmada allopürinolun 300 mg/kg dozunda 5 gün kullanılmasının inflamasyonu azalttığı ve başparmak duyusunda daha hızlı bir iyileşme sağladığı kanıtlanmıştır (Waikakul, Unnanantana et al. 1999).

Deneysel çalışmalar ayrıca nonsteroidal anti-inflamatuar ilaçların, vazodilatör ajanlardan prostoglandin E_1, prostoglandin I_1, nitrendipin ve prostasiklinin, serbest oksijen radikal kurtarıcısı olarak desferroksaminin koruyucu etkileri olduğunu göstermiştir (Lepore, Knight et al. 1994, Gurtner, Neligan et al. 2012).

NO oksidasyon sürecinin fizyolojik bir son ürünü Nitrit, SOD benzeri aktiviteye sahiptir. NOS enzimi oksijen yokluğunda inaktif olduğunda iskemik koşullarda alternatif NO kaynağı sağlamak için, nitrit NO' ya indirgenir. İskemi varlığında reperfüzyondan önce ya da reperfüzyon esnasında nitrit tedavisinin myokard enfarktüsü, inme, karaciğer iskemisi, renal iskemi ve iskelet kasında iskemi durumlarında I/R hasarını önlediği ve

azalttığı görülmüştür (Duranski, Greer et al. 2005, Arieli, Nahmany et al. 2008, Murata, Nozaki et al. 2012).

Antioksidan, antiinflamatuar ve ROT kurtarıcısı ve NAC gibi thiol indirgeyicisi bir molekül olan erdosteinin de alt ekstremitede I/R hasarı oluşturulan deney hayvanlarında AC hasarını azalttığı gösterilmiştir (Sirmali, Uz et al. 2007).

2.3.2.4. Lökosit İnhibisyonu Yapan Antikorlar

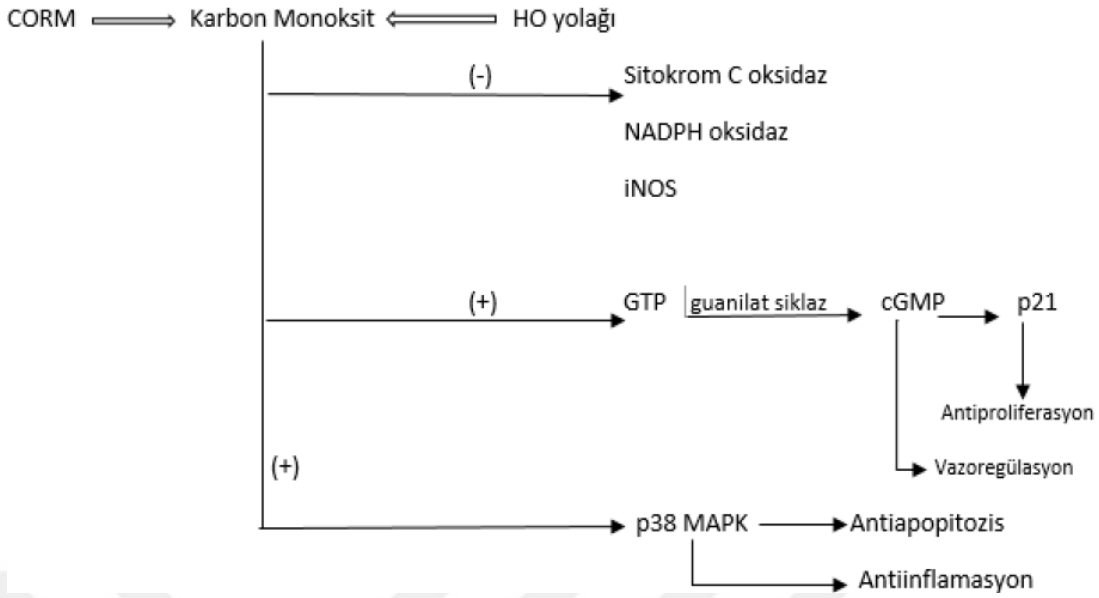
Deney hayvanı modellerinde PMNL' lerin damar endoteline adezyonu engellendiğinde reperfüzyon hasarının azaldığını gösteren çalışmalar literatürde mevcuttur (Simpson, Todd et al. 1988). Antiadhezyon terapi, I/R hasarını önlemede yeni bir tedavi yolu sunmasına rağmen, CD11/CD18 integrin reseptörüne karşı antikor kullanılan bir klinik denemede, kalp hastalarında primer anjiyoplastiden sonra infarkt boyutunun azaltmakta başarısız olduğunu gösteren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Faxon, Gibbons et al. 2002). İnflamatuar hücre adezyonunu engellemek için, selektin, integrin ve intraselüler adezyon moleküllerinin monoklonal antikorlarla birlikte etkilerinin inhibe edilmesinin I/R hasarını önleyebileceğini ileri süren çalışmalar mevcuttur, fakat henüz klinikte tedavi edici ajan olarak uygulaması konusunda herhangi bir çalışma ya da tecrübe mevcut değildir (Gurtner, Neligan et al. 2012).

2.3.2.5. I/R Hasarı Deney Modelinde Kullanılan Antioksidan, Antiinflamatuar ve Vazodilatör Etkili İlaçlar

2.3.2.5.1. Karbon Monoksit Releasing Molekül-3 (CORM-3)

NO' nun keşfi ve Karbon monoksit (CO) ile olan benzer yapısal özelliklerinin öğrenilmesi sonrasında, CO' nun da vasküler tonusta rol oynayabileceği düşünülmüştür. Fakat akla gelen ilk soru, canlı organizmalarda CO' nun toksik etkilerinin olduğudur (Karaavcı 2017). Son yıllarda CO üzerine yapılan çalışmalarda bu molekülün vasküler, antiapopitotik, antiproliferatif ve nöroprotektif etkilerinin olduğu tespit edilmiştir. Endotelyal hücrelerden açığa çıkan CO, düz kas hücrelerinde ve dolaşımdaki kan

hücrelerinde önemli parakrin etkiler göstermektedir (Dulak, Józkowicz et al. 2002). CO, büyük ve küçük damarlarda kas tonusunu sürdürmede etkili olduğu gibi, vasküler düz kas hücrelerinde gevşemeye de yol açabilmektedir (Kaide, Zhang et al. 2001). CO' nun kan basıncını düşürebilme etkisi, direkt vazodilatasyon yaparak veya indirekt olarak glutamaterjik transmisyon yoluyla beyindeki nükleus traktus solitariusu etkileyerek olabilmektedir (Morse and Sethi 2002). Vasküler yaralanma sonucu vasküler düz kas hücrelerinin, yıkıma uğrayan endotelyal hücrelerin Hemoksijenaz-1 (HO-1) enzimini indüklemesi sonucu açığa çıkan CO vazodilatasyon, antiproliferasyon ve antitrombotik özellikler edinir (Stanford, Walters et al. 2003). Kan damarlarındaki lokal hasarlanma sırasında, dolaşımda bulunan ve IL (İnterlökin) -1β, TNF-α gibi inflamatuar sitokinleri salıveren monositler ve makrofajlar, hasarın olduğu bölgeye intikal ederler (Morisaki, Katayama et al. 2002). Bu inflamatuar mediyatörler, bölgeye geldikten sonra lokal olarak sitokin seviyelerinde artışa yol açarlar ve bunun sonucunda da HO-1 enzimi indüklenir. Açığa çıkan CO ise cGMP miktarını artırarak plateletlerin ve nötrofillerin migrasyonunu önler (Nakao, Kimizuka et al. 2003). HO-1 enzimi, Mitojen Aktive Protein Kinaz (MAPK) enzimini aktive ederek endotelyal hücre apopitozisini de önlemektedir (Brouard, Otterbein et al. 2000). Vasküler endotelyal hasar sonucu HO-1' in aktivasyonu ve sonrasında açığa çıkan CO, hasar bölgesindeki vasküler düz kas hücrelerinde vasküler spazmı ve düz kas hücre proliferasyonunu önleyerek vasküler homeostazisi sağlar (Otterbein, Zuckerbraun et al. 2003). Tüm bu çalışmalar CO'nun yaşayan organizmalardaki fizyolojik ve patolojik birçok olayla ilişkisi olduğu gerçeğini ortaya koymuş ve nihayetinde karbon monoksit releasing moleküllerin (CORM) üretimini gerçekleştirmiştir. Son yıllarda laboratuvar ortamında CORM potansiyeline sahip taşıyıcı metil karbonillerle ilintili biyolojik aktiviteler üzerine çalışmalar yürütülmektedir (Clark, Naughton et al. 2003). Bu kompleksler demir, manganez gibi transizyon metalleri içermekte olup koordine bağlarla CO gruplarını bağlarlar. CO, bahsi geçen transizyon metallerinden ayrıldıktan sonra geriye kalan metal karbonil gruplarının toksisitesi üzerine herhangi bir çalışma yoktur. Ama ne $[Mn_2(CO)_{10})]$ (CORM-1)' in ne de $[Ru(CO)_3Cl_2]_2$ (CORM-2)' nin 400 mikromol/L konsantrasyonlarına ulaşana dek hücrelerde yaşam belirtilerini azalttığına dair bir etki gözlenmemiştir (Yabluchanskiy, Sawle et al. 2012) (Şekil 13), (Karaavcı 2017).

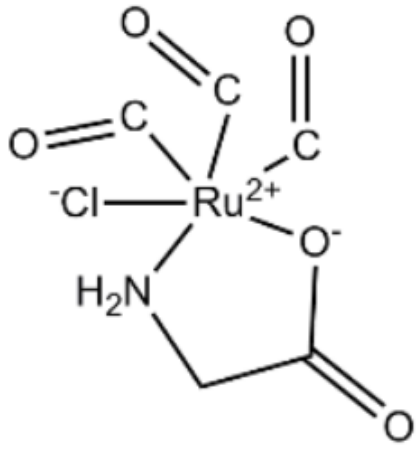


Şekil 13. HO yolağı veya CORM tarafından üretilen CO' nun metabolizması

CORM-3, cGMP üretimini artırıp vasküler relaksasyondan sorumlu olan K^+ kanallarını aktive ederek vazodilatör etkisini göstermektedir (Alshehri, Bourguignon et al. 2013). Orijinal CORM' lar sadece organik çözücülerde çözünebilen ve CO' yu salıverebilmesi için ışık, sterik ligandlar gibi fiziksel ve kimyasal müdehalelere ihtiyaç duyan komplekslerdir. CO' yu rahatlıkla salıverebilen ve suda çözünebilen ilk modifiye molekül, trikarbonilkloro (glisinat) rutenyum(II) olan CORM-3' tür (Clark, Naughton et al. 2003), (Şekil 14), (https://www.adooq.com/corm-3.html) .

CORM-3, terapötik amaçlar doğrultusunda kullanılabilen ve CO' nun salıverilmesi açısından farmakolojik olarak aktif olan bir bileşiktir. CORM-3' ün biyolojik sistemlerde CO' yu salıverme süresi 1-5 dakika arasında değişmektedir. CORM-3 insan plazmasında, hücre kültüründe, fizyolojik solüsyonlarda ve biyolojik sıvılarda CO' yu salıvermesine rağmen, oda sıcaklığında, suda veya asidik pH' da 24 saatten fazla stabil halde kalabilmektedir (Yabluchanskiy, Sawle et al. 2012). CORM-3 de diğer CORM deriveleri gibi biyolojik ortamlarda CO' yu hızla salıvermektedir. Bu sayede CORM-3 nörotransmisyon, akut hipertansiyon, anjina ve I/R ile ilgili yapılacak deneysel çalışmalarda terapötik dozlara kolayca ulaşabilir (Chatterjee 2004). CORM-3'

ün toksik olmadığı ve terapötik konsantrasyonlarda dahi hücrelere olumsuz bir yönde reaksiyona yol açmadığı gösterilmiştir.

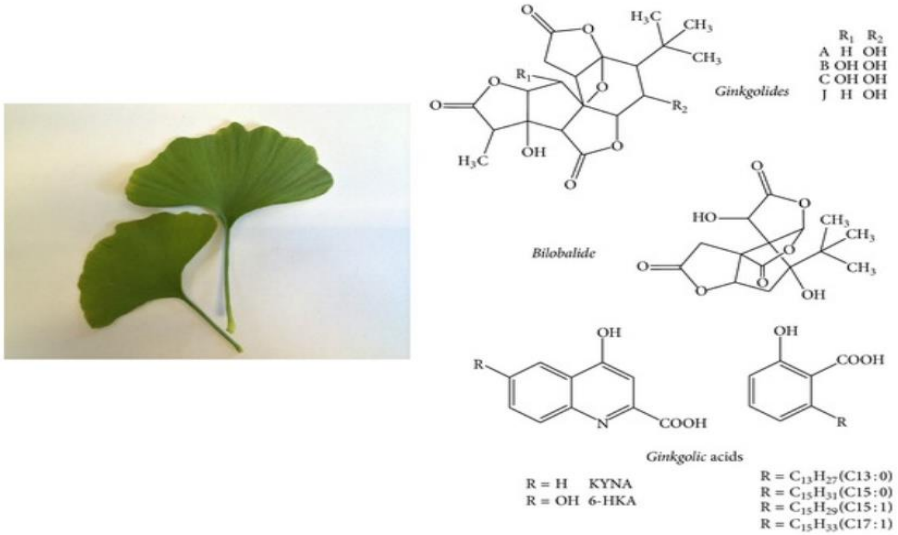


Şekil 14. CORM-3' ün kimyasal yapısı

CORM-3 iskelet kası I/R hasarı, hemorajik şok, kompartman sendromu, iskemik inme, akut miyokard enfarktüsü, postiskemik myokard enfarktüsü iyileşmesi, renal transplantasyona bağlı hücre ölümü, renal iskemiye bağlı akut böbrek yetmezliği, kardiyoprotektif ve renoprotektif etki gibi iskemi-reperfüzyon hasarının birçok spektrumunda çalışılmıştır (Clark, Naughton et al. 2003, Vera, Henegar et al. 2005, Tayem, Johnson et al. 2006, Caumartin, Stephen et al. 2011, Filippo, Perretti et al. 2012, Stein, Bolli et al. 2012, Sener, Tran et al. 2013, Lawendy, Bihari et al. 2014, Yoon, Lee et al. 2017, Segersvärd, Lakkisto et al. 2018, Wang, Zhang et al. 2018, Bihari, Chung et al. 2019, Kumada, Takahashi et al. 2019, Zhang, Zhang et al. 2019, Fu, Zhang et al. 2020). Yapılması planlanan bu tez çalışmasının farkı, CORM-3' ün iskelet kası I/R hasarındaki proflaktik etkinliğinin literatürde ilk defa değerlendirilmesi ve ilk defa GbE ve I/R hasarında rutin olarak kullanılan ilaçlardan olan NAC ve Pentoksifilin ile kıyaslanmasıdır.

2.3.2.5.2. Gingko biloba Ekstresi (GbE-761)

GbE uzakdoğuda yetişen, gingko biloba bitkisinin bilinen adıyla mabed ağacının yapraklarının standardize edilmiş ekstresidir. Ana etken madde olarak yaklaşık %3.1 gingkolid (Gingkolid A,B ve C karışımı) ile %2.9 bilobalid gibi etkin terpenlaktonları ve %22-27 oranında flavonoidleri içerir. GbE' nin özel bir ekstre preperatı olan GbE-761 çok sayıda farmakolojik ve klinik denemeye tabi tutulmuştur. Farmakolojik deneylerde gingkolidlerin bir proinflamatuar otokoid olan platelet aktive edici faktör (PAF) antagonisti, antioksidan, vazodilatör, antitrombositik, antitrombotik ve kan akışkanlığını artırıcı etkinliğinin olduğu ayrıca bozulmuş bellek ve diğer bilişsel işlevleri düzeltici etkinliğe sahip olduğu gösterilmiştir. Ağır olmayan periferik okluziv arter hastalıklarında, başta ağrısız yürüme mesafesi olmak üzere iskemik belirtiler üzerinde yararlı olabildiği kontrollü denemelerde gösterilmiştir. Bu bakımdan etkileri pentoksifiline benzer. Yan tesirleri genellikle hafiftir ve sık görülmez; ancak yüksek dozda kanama riskini artırabilir (Kayaalp 2012). Karaciğerde sitokrom (CYP) enzimleri tarafından metabolize edilen Gingko biloba ekstresinin yarılanma ömrü 2-4 saat arasındayken, plazmada 1,5-3 saat arasında tepe konsantrasyon değerine ulaşır. Plazma konsantrasyonları 24 saatte bazal değerlerine dönen Gingko biloba ekstresi böbrekler ve feçes yoluyla vücuttan atılır (Diamond, Shiflett et al. 2000), (Şekil 15), (https://www.drugs.com/pro/pentoxifylline.html).



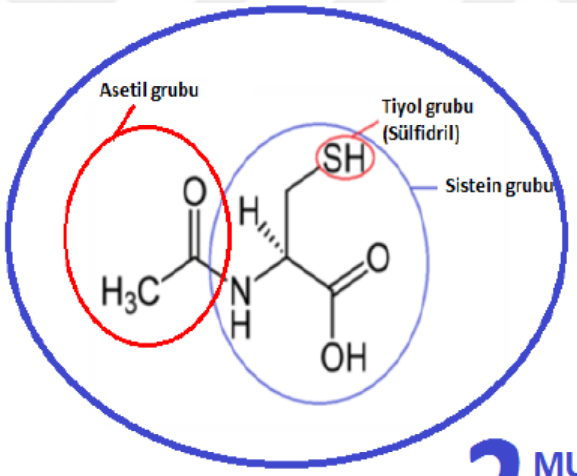
Şekil 15. Gingko biloba yaprakları ve GbE-761' in önemli bileşenlerinin kimyasal yapısı

Fosil kayıtları 150-200 milyon yol öncesine dayanan ve 2000-4000 yıldır var olduğu düşünülen ve kayıtlara bakıldığında 5000 yıl öncesinde Çin kaynaklarında tedavide kullanılan GbE vazodilatör, antioksidan, antienflamatuar ve antitrombotik özelliklerinden dolayı I/R hasarının birçok spektrumunda kullanılmıştır. Ovaryum, testis, myokard, AC, spinal cord, beyin, böbrek, bağırsak, mesane, retina ve karaciğer gibi birçok dokuda iskemi-reperfüzyon modelleri için kullanılmış olması GbE'nin alt ekstremite iskemi reperfüzyon deneylerinde de kullanılabilmesini mümkün kılmaktadır. Yapılması planlanan bu tez çalışmasının farkı, birçok dokuda iskemi-reperfüzyon modeli için kullanılmış olan GbE' nin literatürde ilk defa alt ekstremite I/R modelinde çalışılmasıdır (Szabo, Droy-Lefaix et al. 1995, Kim, Kwak et al. 1998, Topp, Knoefel et al. 2001, Zhang, Zu et al. 2004, Sener, Sener et al. 2005, Liu, He et al. 2007, Yenilmez, Kilic et al. 2007, Akgül, Ayyildiz et al. 2008, Keles, Demirci et al. 2008, Cheng, Wang et al. 2011, Kanter 2011, Yang, Liu et al. 2013, Akdere, Tastekin et al. 2014, Badem, Ugurlucan et al. 2014, Jin, He et al. 2014, Liu, Zhou et al. 2014, Li, Luo et al. 2015, Tian, Wang et al. 2015, Yao, Chen et al. 2015, Ahmed, Lasheen et al. 2016, Yildirim, Simsek et al. 2018, Li, Zhang et al. 2019, Song, Zhao et al. 2019, Xiao, Lyu et al. 2019, Zhang, Zhang et al. 2019).

2.3.2.5.3. N- Asetilsistein (NAC)

Asetilsistein, N-Asetilsistein, N-asetil-L-sistein ya da kısaltmalarda bilinen adıyla NAC doğal bir aminoasit olan L-sisteinin asetillenmiş türevi olan güçlü bir antioksidandır ve hücre içi glutatyon seviyesini artırarak etki gösterir. Hidrolitik enzimlerin sindirim işlemlerinde glutatyon kullanmasından dolayı, glutatyonun biyolojik olarak desteği çok başarılı değildir. Biyolojik olarak glutatyonun göreceli erişilebilirliğine rağmen, glutatyon resentezi için sınırlı substrat oranından dolayı kandaki sistein erişilebilirliğinin sürdürülmesi zorunludur. NAC, sistein havuzunun devamının sağlanmasında kullanılan ajanlar arasında en yaygın kullanılan moleküldür (Lejay, Paradis et al. 2018). İlave olarak mitokondrilerde hipokloröz asit, hidrojen peroksit, superoksit maddeleri gibi reaktif oksijen radikal kurtarıcısıdır. NAC, organizmada L-sisteinden üretildiğinden ve doğal sülfür içeren aminoasit türevi olduğundan güçlü bir antioksidan olarak kabul edilmektedir. Basit bir antioksidan ilaç olmayan NAC, glutatyon prekürsörü, okside

tiyollerin (SH) kimyasal indirgeyicisi, ROT kurtarıcısı ve intraselüler antioksidan mekanizmaların da regülatörüdür. Direkt antioksidan etkisini, yapısındaki -SH grubunun hidrojenini kolayca oksijen radikallerine vererek onları doyurup, suya indirgeyerek gösterir. Yapısındaki sistein grubu aracılığıyla da indirekt antioksidan etkisini gösterir. Ayrıca azalmış endotel bağımlı releasing faktör aktivitesini restore ederek mikrosirkülasyonu artırır ve aynı zamanda antiagregan özellikleri de mevcuttur (Knight, MacPhadyen et al. 1991, Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016, Söğüt 2017). Sitoprotektif özelliğe de sahip olan NAC molekülü, yine yapısındaki -SH (sülfhidril) grubunun etkisiyle mukolitik özelliklerinden dolayı klinik pratikte yaygın bir şekilde kullanılmaktadır (Erturk, Cekic et al. 2009), (Şekil 16), (Söğüt 2017). Karaciğerde CYP450 enzimleri tarafından metabolize edilen NAC, plazmada 1-3 saat sonra maksimum konsantrasyonuna ulaşıp, 16-20 saat sonra sistein konjugatları şeklinde yapısı bozulmadan idrarla atılır (MacNee, Bridgeman et al. 1991).



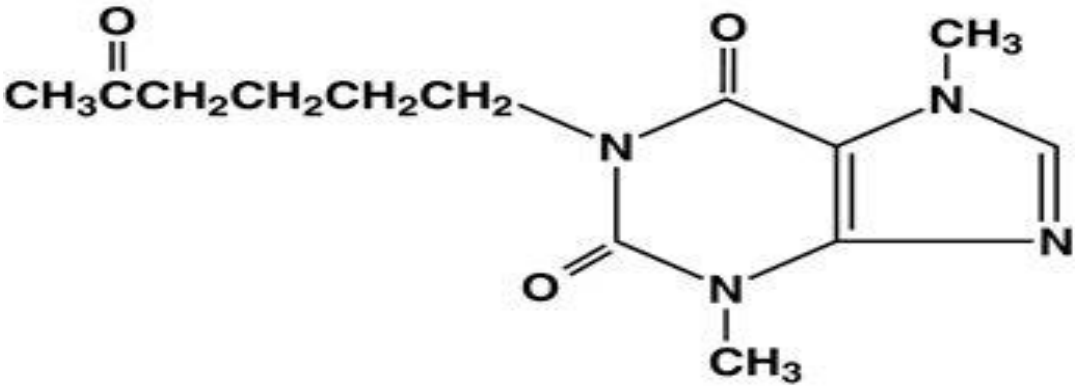
Şekil 16. N-asetilsisteinin kimyasal formülasyonu

Mitokondrilerdeki oksidatif fosforilasyon elektron transportunun ana bileşenlerinden birisi olan, ubikinon olarak da adlandırılan KoenzimQ$_{10}$ ve maya, mantar, arpa ve yulaf hücre duvarlarından elde edilen, serumdaki sağlıksız kolesterol miktarını azaltan ve immun sistemi güçlendiren bir ajan olan β-Glukan ve NAC' ı içeren çalışmalar da literatürde mevcuttur (Bolcal, Yildirim et al. 2007).

Nöroprotektif bir ajan olmasının yanında antioksidan ve antiinflamatuar özellikleri de olan etil pirüvatın, vazodilatör, antitrombotik, antiinflamatuar ve antioksidan etkileri olan sildenafilin, fenol bazlı serbest radikal kurtarıcılarına kimyasal olarak benzeyen propofolün, vazodilatör, antitrombotik, antioksidan özellikleri olan ilioprost(prostoglandin I_2) ve alprostadilin (prostoglandin E_1) I/R hasarını önlemek ve tedavi etmek için NAC ile birlikte karşılaştırıldığı çalışmalar da literatürde mevcuttur (Erturk, Cekic et al. 2009, Aksu, Yüksel et al. 2015, Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015, Suha, Asli et al. 2016, Çevirme, Adademir et al. 2018).

2.3.2.5.4. Pentoksifilin

Pentoksifilin(okspentifilin) ise, bir ksantin türevi (teofilin benzeri) olup, fosfodiesteraz-5 enzim inhibisyonu yaparak eritrositlerin esnekliğini (fleksibilitesini veya deformabilitesini) artırır ve hücre içi cAMP düzeyini yükseltir. Periferik vazodilatör ilaçların çoğundan farklı olarak kanda reolojik etkiler de gösterirler ve kan vizkositesini azaltarak kan akışkanlığını artırır. Bu etkileri sayesinde aynı zamanda trombosit agregasyonunu da azalttığı görülmüştür. Proinflamatuar sitokin üretimini azaltarak endotel fonksiyonu ve doku oksijenizasyonunu artırır (Kvist, Jozsa et al. 1991, Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). Pentoksifilin 5'- Nükleotidaz enzimini inhibe ederek etki gösterir ve bu enzimin inhibisyonu sonucunda dokuda ATP kaybını azaltmakta, iskemi dönemi ve sonrasında doku enerji tüketimini minimumda tutarak hücre hasarını engelemektedir. Pentoksifin etkisini özellikle iskemik alanlara kan akımını artırarak göstermektedir (Sönmez 2018). Mide bağırsak kanalından iyi absorbe edilen ve karaciğerde metabolize edilen Pentoksifilin molekülünün yarılanma ömrü 2 saattir ve plazma proteinlerine bağlanmayan bu molekülün %93-95' i böbrekler yoluyla atılır (Samlaska and Winfield 1994), (Şekil 17), (https://www.drugs.com/pro/pentoxifylline.html).



Şekil 17. Pentoksifilin molekülünün kimyasal formülasyonu

Pentoksifilin hiperkoagülopatiyi engeller, yara iyileşmesinde rol oynar, immunmodülatör olarak etki gösterir. Klinik pratikte serebrovasküler hastalıklar, intermittant klaudikasyo ve sepsis durumlarında yaygın olarak kullanılmaktadır (Sönmez 2018). Pentoksifilin klaudikasyo olan kaslarda mitokondri fonksiyonlarını düzeltir ve en fazla düzelme, başlangıçta en kötü durumdaki mitokondrilerde olur (Boska, Shepard et al. 2002). Bacak arterlerinin hastalıklarında periferik vazodilatörlerin çoğu, intermittan klaudikasyo yani ağrı oluşuncaya kadar hastanın yürüyebildiği mesafeyi(ağrısız yürüyebilme mesafesi), (pain-free walking distance) belirgin derecede değiştirmezler. Ancak pentoksifilinin hemoreolojik etkileriyle bu mesafeyi artırabildiği yürüyen zeminli ergometrede yapılan incelemelerde gösterilmiştir (Kayaalp 2012). Literatürdeki güncel çalışmalar, pentoksifilinin nötrofillerin kemotaktik yanıtını artırabildiğini, nötrofil ve monositlerde fagositoz ve süperoksit üretimini inhibe ettiğini göstermiştir (Vadiei, Brunner et al. 1989). I/R-indüklenmiş spinal kord hasarı olan hastalarda 50 mg/kg/gün pentoksifilin desteğinin inflamatuar indeks ve oksidatif stresin azalmasında yararlı etkisi olduğu görülmüştür (Savaş, Delibaş et al. 2002). Bu gibi çalışmaların klinik faydalarına bakılacak olursa, pentoksifilin molekülü AC, bağırsak, böbrek ve spinal kord dokusundaki I/R hasarını azalttığı gibi kas dokusunda da I/R hasarını azaltabilir.

Plastik cerrahi klinik pratiğinde sık kullanılan antioksidan, antiinflamatuar, vazodilatör ve antitrombotik etkilere sahip ilaçlardan olan NAC ve pentoksifilin, dünyada en yaygın kullanılan herbal preperatlardan birisi olan GbE kolay ulaşılabilir olması, maliyet olarak uygun olması, terapötik dozlarının üzerinde bile ciddi toksik etkilerinin olmaması, karaciğerde elimine edilip, farmakokinetik etki sürelerinin de birbirine yakın

olması gibi nedenlerden dolayı deney modelinde tercih edilen tedavi ajanları olmuşlardır. CORM-3 molekülünün proflaktik etkinliği ve Gingko biloba' nın alt ekstremite I/R modelinde küratif etkinliği açısından terapötik hedef olarak tıp camiasına sunulması planlanmaktadır. Bahsedilen bu dört molekülün etkilerinin birbirleriyle biyokimyasal, patolojik ve anjiozomik olarak üç farklı parametre ile karşılaştırılması literatürde ilk kez yapılmış olacaktır.

2.3.3. I/R Hasarı Takibinde Kullanılan Biyokimyasal Enzimler

Reperfüzyon hasarının tanı, tedavi ve takibinde birçok biyokimyasal belirteç(marker) denenmiş ve bunlardan bazıları klinik olarak rutin kullanıma girmiştir. Plastik cerrahi alanında özellikle replantasyon ve flep cerrahisinde, iskelet kası hasarının değerlendirilmesinde kullanılabilecek potansiyel bir biyokimyasal belirteç belirlenmesinde büyüyen bir ilgi vardır. CK, Laktat dehidrogenaz (LDH), Myoglobin, Aspartat aminotransferaz (AST), Beyin natriüretik peptid (BNP), Atriyal natriüretik peptid (ANP), Karbonik anhidraz, Troponin ve yapısal kas proteinleri kullanılabilecek olan biyokimyasal belirteçlerdendir (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015).

CK konsantrasyonları, tarihsel olarak kas hastalıkları ve ciddi kas hasarının araştırılmasında kullanılmış ve günümüz klinik pratiğinde rutin olarak kullanıma girmiştir. CK enzimi, klinikte en sık kullanılan ve kas hasarının araştırılmasında en yüksek hassasiyete sahip olan bir biyokimyasal belirteçtir. CK, kasılma veya taşıma sistemlerindeki ATP yenilenmesini sağlayan bir enzimdir. CK' nın en aktif olduğu yer iskelet kasıdır. CK, kas hücresinde fizyolojik bakımdan fonksiyonel olarak aktif hale gelir. Kasın her kontraksiyon döngüsünde, kreatin fosfat kullanılarak ATP oluşur. Bu sonuç kasın ATP düzeyini sabit tutar. Geri dönüşlü olan bu reaksiyonda CK, katalizör görevi görür (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). Tez çalışmasında yapılacak olan deneyin sonuçlarını değerlendirmek için kullanılacak olan biyokimyasal parametrelerden birisi CK enzimi olacaktır.

Kas hasarının araştırılmasında en sık kullanılan ikinci biyokimyasal belirteç ise LDH enzimidir. LDH enzimi ise glikolizin anahtar enzimidir. Laktat ve pirüvatın

birbirine dönüşümünü nikotinamid adenin dinükleotid (NAD^+) katalizörlüğünde indükler. Glikolitik yolun bu önemli enzimi bütün hücrelerinin stoplazmasında bulunur. Akut ya da uzun süreli kas hasarı veya I/R hasarı durumlarında LDH enzimi de CK enzimi ile birlikte serumda artış gösterir. Rabdomiyolizin en yaygın ve en korkulan komplikasyonu akut böbrek yetmezliğidir ve hastaların %30' unda görülür. Akut böbrek yetmezliği olgularının ise %8' inde rabdomyoliz görülür. İskelet kası sarkolemmasının hasarı sonucunda kas hücresi ölümü ve dolaşıma büyük miktarlarda myoglobin salınımı olur ve myoglobinürik akut böbrek yetmezliği oluşur. Miyoglobin, 17.000 daltonluk küçük molekül ağırlıklı bir globin zinciri içinde çevrili, hemoglobine benzer bir hem pigmentidir (Samlaska and Winfield 1994). İskelet kası hasarı ve sonucunda oluşacak böbrek yetmezliğinin takibinde en sık kullanılan üçüncü molekül ise myoglobindir. Tez çalışmasındaki sonuçların biyokimyasal olarak incelenmesinde kullanılacak olan son belirteç ise; myoglobin proteini olacaktır.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu' nun 24.05.2019 tarih, 6 sayılı oturumun 100 no' lu ve 26.09.2019 tarih, 11 sayılı oturumun 157 no' lu kararı ile yapıldı. Mevcut tez çalışması Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje Ofisi tarafından 08.11.2019 tarih 2019/9 nolu toplantı ve 7460 proje numarasıyla desteklendi. Tüm çalışma aynı araştırıcı tarafından yürütüldü.

Bu çalışma Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi'nde yapıldı ve deney modelimizdeki sıçanlar da yine aynı merkezden temin edildi. Çalışmamızda ağırlıkları 300-350 gr arasında değişen 56 adet Sprague-Dawley cinsi erişkin dişi sıçan kullanıldı. Sıçanlar randomize seçilip sekizer adetten oluşan gruplara ayrıldı. Sıçanlar her kafeste dörder adet olacak şekilde, standart koşullar (21±2 ^{o}C, %40-60 bağıl nem ve 12 saat aydınlık/12 saat karanlık ışık periyodu) altında, yeteri kadar yem ve su verilerek barınmaları sağlandı.

3.1. Power Analiz Çalışması

Tarafımızca yapılan örnek çalışmada, örneklem büyüklüğünü hesaplayabilmek için Atatürk Üniversitesi Biyoistatik Anabilim Dalı'nda power analiz çalışması yapılmıştır. Akut I/R deney modelinde serum CK enzimi üzerinden yapılan analizde, referans makaledeki I/R grubunda CK değeri 3567±500 olarak görüldü. Örnek çalışmadaki I/R+Asist grubunda CK değeri ise 2656±490 olarak tespit edildi (Rosero, Németh et al. 2014). Sonuçların bu değerlerde anlamlı çıkabilmesi için %80 güçte ve %95 güven düzeyinde her bir grupta en az 6 sıçan olması gerekmekteydi. Deney modeline uygulanacak olan anestezi ve kardiyak enjeksiyon işlemlerindeki risklerden dolayı çalışma, en az 8 adet sıçandan oluşacak 7 grup şeklinde planlandı.

3.2. Deney Gruplarının İsimlendirilmesi

Çalışmada 56 adet sıçan her bir grupta 8 sıçan olacak şekilde 7 farklı gruba ayrıldı:

Grup 1 – Kontrol grubu: İskemi yapacak herhangi bir işlemin yapılmadığı, anjiyografik, biyokimyasal ve patolojik değerlendirmeler için temel alınacak gruptur. Bu gruba herhangi bir ilaç enjeksiyonu da yapılmamıştır.

Grup 2 – I/R grubu: Sağ alt ekstremitesinde planlanan iskemi modelinin oluşturulduğu; fakat herhangi bir ilaç enjeksiyonunun yapılmadığı gruptur.

Grup 3 – I/R + CORM-3 grubu: Sağ alt ekstremitesinde planlanan iskemi modelinin oluşturulduğu; 4 saatlik iskemi sonrası reperfüzyondan hemen önce CORM-3 molekülünün etkisini incelemek için 10 mg/kg dozunda intraperitoneal (i.p.) CORM-3 enjeksiyonunun yapıldığı gruptur.

Grup 4 – I/R + Gingko biloba ekstresi: Sağ alt ekstremitesinde planlanan iskemi modelinin oluşturulduğu; 4 saatlik iskemi sonrası reperfüzyondan hemen önce GbE molekülünün etkisini incelemek için 100 mg/kg dozunda i.p. GbE enjeksiyonunun yapıldığı gruptur.

Grup 5 – I/R + N-Asetilsistein grubu: Sağ alt ekstremitesinde planlanan iskemi modelinin oluşturulduğu; 4 saatlik iskemi sonrası reperfüzyondan hemen önce NAC molekülünün etkisini incelemek için 150 mg/kg dozunda i.p. NAC enjeksiyonunun yapıldığı gruptur.

Grup 6 – I/R + Pentoksifilin grubu: Sağ alt ekstremitesinde planlanan iskemi modelinin oluşturulduğu; 4 saatlik iskemi sonrası reperfüzyondan hemen önce pentoksifilin molekülünün etkisini incelemek için 40 mg/kg dozunda i.p. pentoksifilin enjeksiyonunun yapıldığı gruptur.

Grup 7 – CORM-3 + I/R grubu: CORM-3 molekülünün proflaktik etkisinin değerlendirileceği ve iskemiden yaklaşık 1 saat önce 10 mg/kg dozunda i.p. CORM-3 enjeksiyonun yapılıp; turnike ve kilitli kablo bağı ile aynı iskemi modelinin oluşturulacağı gruptur.

3.3.Deney Modelinde Kullanılan Farmakolojik Ajanlar

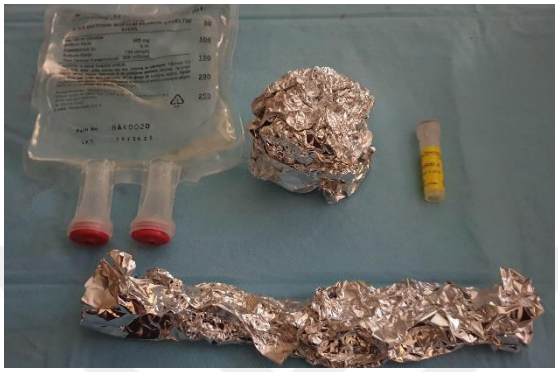
Sıçanlara sevofluran(SEVORANE, Aesica Queenborough Ltd. İngiltere) damlatılmış pamuk bulunan kutuda sedasyon sağlandıktan sonra 25 mg/kg ketamin(KETALAR, Pfizer İlaçları Ltd. Şti. İstanbul) ve 10 mg /kg ksilazin hidroklorür(BASİLAZİN %2, Bavet İlaç İstanbul) ile sol gluteal bölgeden kas içi anestezi verildi (Şekil 18). Supin pozisyonda sıçanlar operasyon masasına yatırıldı. Operasyon sahası tıraş edildi, iyodin solüsyon ile silinip, sıçanlar steril olacak şekilde örtülerek cerrahi işleme hazır hale getirildi. Tüm deneysel işlemler sırasında Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Yönergesine sadık kalındı.



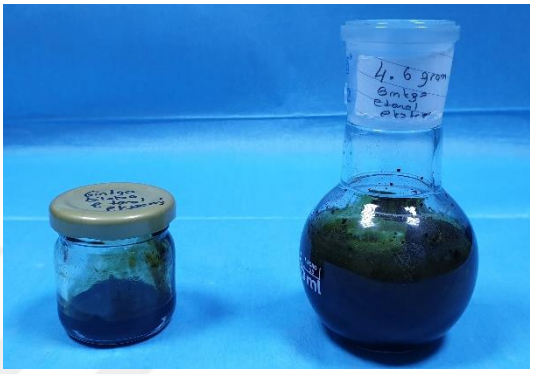
Şekil 18. Deney için kullanılan anestezi ilaçları

I/R hasarını önleme ve tedavi etmeye yönelik medikasyonların karşılaştırılacağı deney modelinde CORM-3 (AdooQ® Biosience, USA, Katolog numarası: A14285), GbE, NAC (Mucinac, Vem İlaç, İstanbul) ve Pentoksifilin (Trentilin, SantaFarma, İstanbul) kullanıldı (Şekil 19). Üretici firma tarafından -20 ºC' de saklanarak teslim edilen

CORM-3, oda sıcaklığında ve karanlık ortamda Atatürk Üniversitesi Farmakoloji Anabilim Dalı'nda serum fizyolojik ile dilüe edildi. Anjiyografik analizler için de İndosiyanin yeşili (ICG) (IR-125, Laser grade, Acros Organics™, USA, Lot Numarası:A0403003 Kod Numarası: 412541000) kullanıldı. Biyokimyasal analiz için gerekli olan bütün çözeltiler analitik saflıkta olacak şekilde hazırlandı.



Şekil 19a. CORM-3 molekülü



Şekil 19b. Gingko biloba ekstraktı



Şekil 19c. NAC molekülü

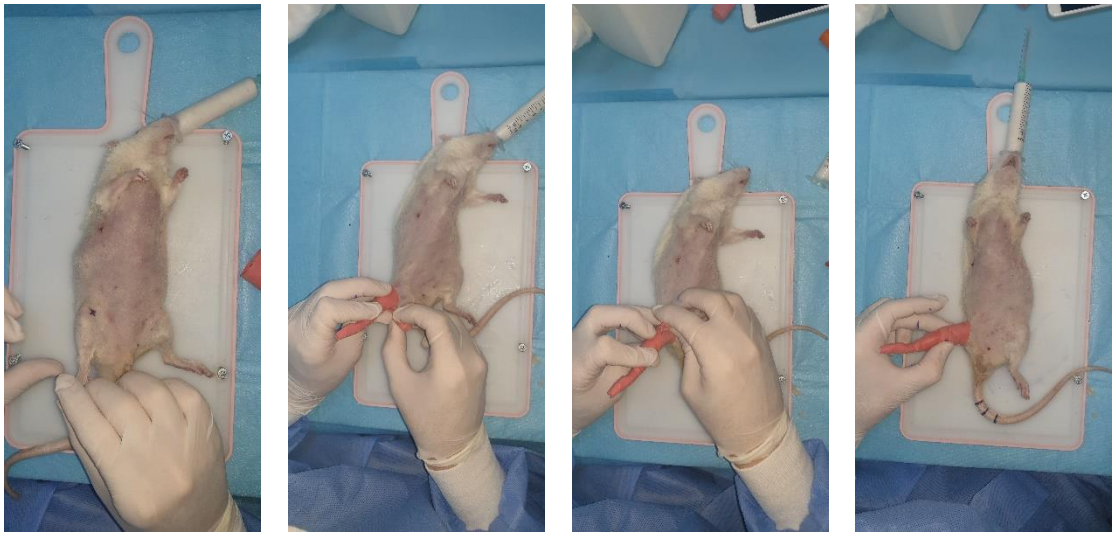


Şekil 19d. Pentoksifilin molekülü

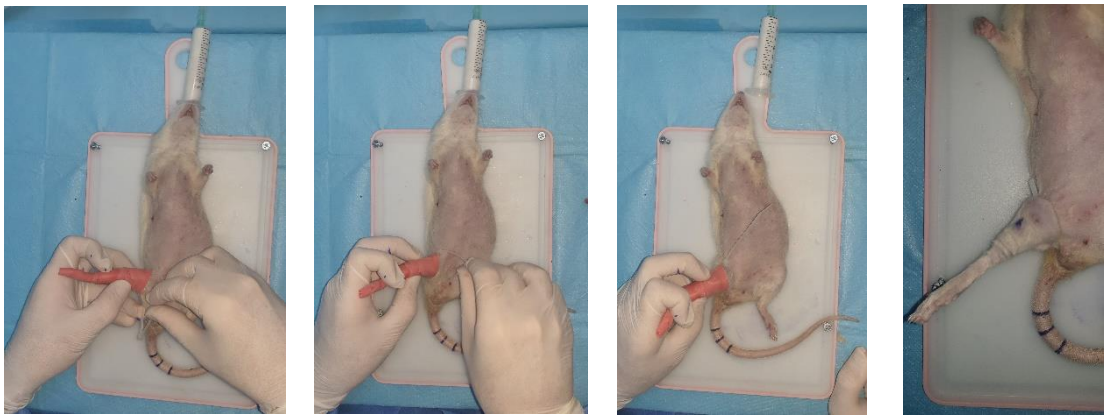
Deney gruplarına CORM-3 molekülü, GbE, NAC ve Pentoksifilin i.p. yoldan verildi. Toz halindeki CORM-3 molekülünün çözelti haline getirilmesi için üretici firmanın direktifleri uygulandı. GbE ise herbaryum numarası kayıtlı olan Gingko biloba yapraklarından (NGBB 8389, BCNG 9082), Atatürk Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmasötik Botanik Anabilim Dalında üretildi ve ilaç usülüne uygun olarak çözelti haline getirildi. Anjiyografik görüntülemede kullanılacak olan toz halindeki ICG' nin çözelti haline getirilmesi için de yine üretici firmanın direktifleri uygulandı.

3.4. I/R Deney Modelinin Oluşturulması

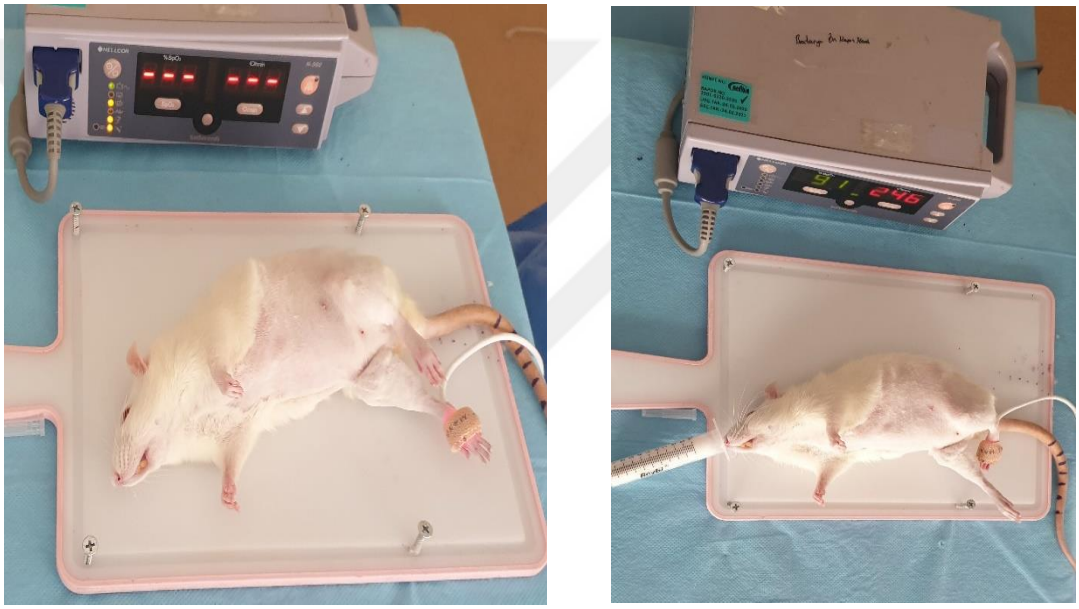
I/R deney modelinin oluşması için Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM)' nde tarafımızca örnek çalışma yapıldı ve istenilen deney modeli elde edildi. Grup 1 kontrol grubu olarak planlandı, Grup 2-3-4-5-6 ise iskemi-reperfüzyon grupları olarak planlanıp, başlangıçta turnike ile 4 saat iskemi yapıldı. İskemi turnike altında Esmarch bandaj (Corvus medical&technical products, İstanbul) kullanılarak yapıldı. Sedasyon anestezisi altında ekstremitenin en distalinden yani ayak parmaklarından başlanarak turnike sarılıp trokanter majör hizasında sonlandırıldı (Şekil 20). Esmarch bandajın dört saatlik iskemi süresi boyunca gevşememesi ve eşit miktarda iskemi oluşturması için kilitli kablo bağı (2,5x150 mm, Çet-san Elektrik, Ankara) eşit bir şekilde sağ alt ekstremitede kilitlenip, istenilen iskemi modelinin oluşması sağlandı (Şekil 21). Tüm gruplarda istenilen iskemi modelinin eşit miktarda oluşup, alt ekstremiteye ait nabızların tamamen kaybolduğunu anlayabilmek için pediyatrik pulse oksimetre cihazı (NellcorTM, Medtronic USA) ile ekstremitenin en distalinden oksijen saturasyonu ve nabız kontrolü yapıldı (Şekil 22).



Şekil 20. Esmarch bandaj işleminin uygulanması

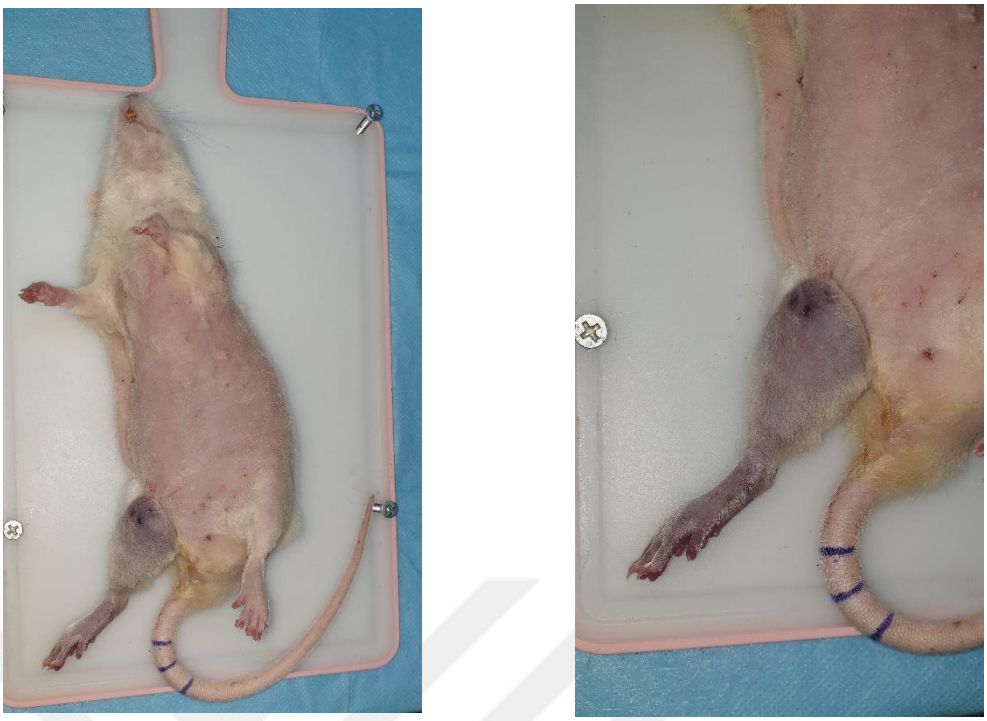


Şekil 21. Kilitli kablo bağı ile iskemi modelinin oluşturulması

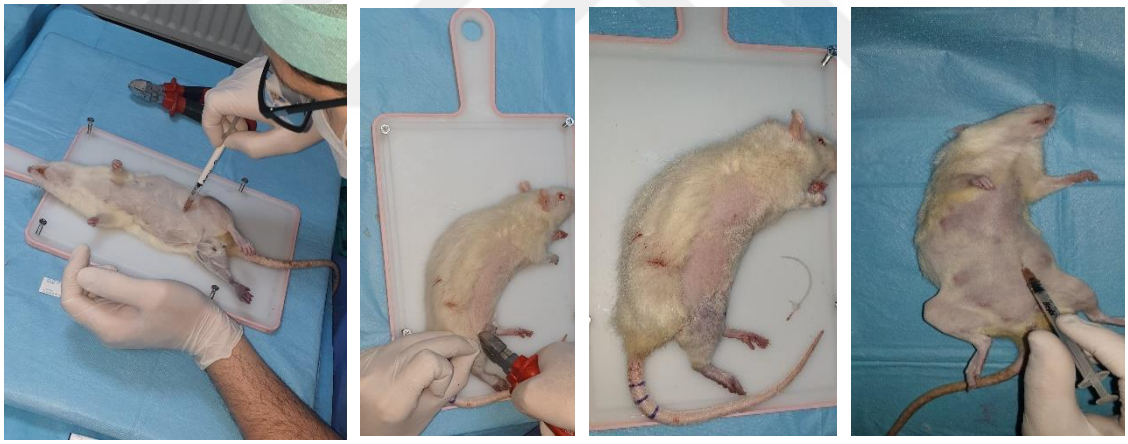


Şekil 22. İskemi yapılan sağ alt ekstremite iskemi modelinin kontrol edilmesi ve sol alt ekstremiteyle pulse oksimetre cihazı kullanılarak karşılaştırılması

Kontrol grubu olan Grup 1 hariç, tüm gruplardaki deneklere deney modelinde anlatıldığı gibi 4 saat iskemi yapıldı (Şekil 23). İskemi sürelerinin tamamlanmasından sonra, Grup 1 ve 2' ye herhangi bir ilaç enjeksiyonu yapılmadı; Grup 3-4-5-6 ya ise 4 saatlik iskemi süresinin sonunda turnike açılmadan önce sırasıyla CORM-3, GbE, NAC, Pentoksifilin ilaçlarının i.p. enjeksiyonları yapıldı. Grup 7 ye ise CORM-3 molekülünün proflaktik etkisini de değerlendirmek amacıyla turnike ile I/R hasarı oluşturulmadan yaklaşık 1 saat önce, intraperitoneal ilaç enjeksiyonu yapılıp, yine turnike ile 4 saat iskemi yapıldı (Şekil 24).



Şekil 23. 4 saatlik iskemi süresi sonrası sağ alt ekstremitenin görünümü



Şekil 24. İskemi süresinin sonunda Grup 2-3-4-5 ve 6' ya ilaç enjeksiyonlarının yapılıp, kilitli kablo bağının açılması ve Grup-7 ye iskemiden 1 saat önce proflaktik CORM-3 enjeksiyonunun yapılması

3.5. Verilerin Elde Edilmesi

3.5.1. Biyokimyasal Verilerin Elde Edilmesi

Tüm gruplarda turnike açıldıktan yani reperfüzyondan 4 saat sonra, kalp atımı parmak ucuyla palpe edilip sternumun solundan, interkostal aralık kullanılarak kalbe girildi ve 25

Gauche (G) iğne ucu kullanılarak intrakardiyak yoldan CK, LDH ve Myoglobin çalışılması için yaklaşık olarak 3 cc kan örneği alınıp biyokimya tüplerine transfer edildi (Bayramiçli 2005) (Şekil 25). Biyokimyasal incelemeler sonrası elde edilen değerler kontrol (Grup 1) ve iskemi (Grup 2) gruplarıyla karşılaştırıldı.



Şekil 25. Biyokimyasal değerlendirmeler için kan örneği alınması

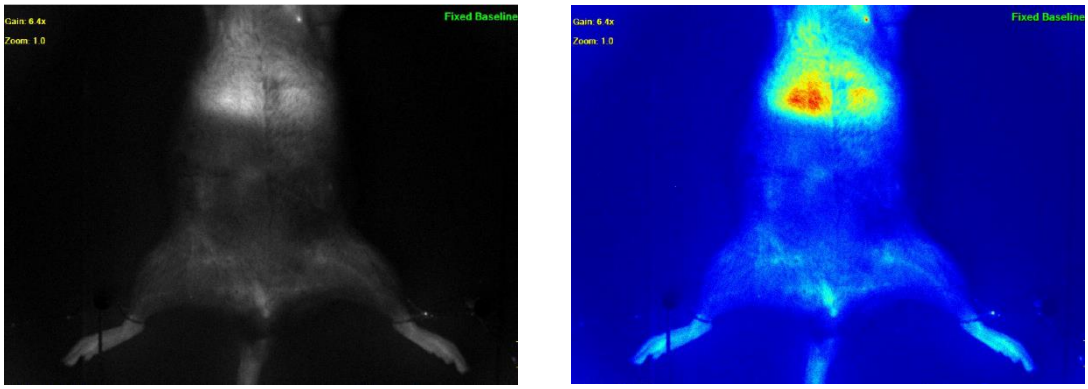
3.5.2. ICG Kullanılarak SPY Cihazı ile Anjiyografik Ölçümlerin Yapılması

Enzim ölçümleri için yeterli miktarda kan örneği alındıktan sonra, deney modelindeki sonuçların değerlendirilmesinde kullanılacak olan ikinci parametre ise, SPY Floresan Görüntüleme Sistemi (Novadaq Technologies Inc, Richmond, British Columbia, Kanada) ile ekstremite perfüzyonunun değerlendirilmesidir. SPY, çeşitli cerrahi işlemler sırasında lenfatikler ve kan damarları dahil dokuların dolaşımı ve perfüzyonunu yakın kızılötesi floresans ışınlarla görüntülemekte kullanılan bir cihazdır. SPY cihazında anjiografik görüntüleme maddesi olarak ‘’İndosiyanin yeşili’’ (İndocyanine green) (ICG) kullanıldı. ICG, steril, suda çözünen, trikarbosiyanin bir boyadır ve kan plazması ve kandaki tepe spektral absorbsiyonu 800-810 nanometre (nm) olan bir maddedir. İntrakardiyak enjeksiyonla 0,3 mg/kg dozunda indosiyanin yeşili enjekte edilip, anlık doku perfüzyon görüntülemesi yapan SPY cihazı ile ekstremite perfüzyonu anjiyografik ve anjiyozomik olarak değerlendirildi (Şekil 26). Gruplardaki tüm sıçanlarda ortak referans nokta olarak kuyruk proksimali SPY cihazı ile %100 olarak belirlendi. Sıçan sağ alt ekstremite proksimali yani trochanter majör, ekstremitenin orta noktası yani diz eklemi (articulatio genu) ve turnike yapılan bölgenin en distali olan ayak parmakları (distal falanks) hizası referans anatomik noktalar olarak kullanılıp iskemi-reperfüzyon hasarına uğramayan sol

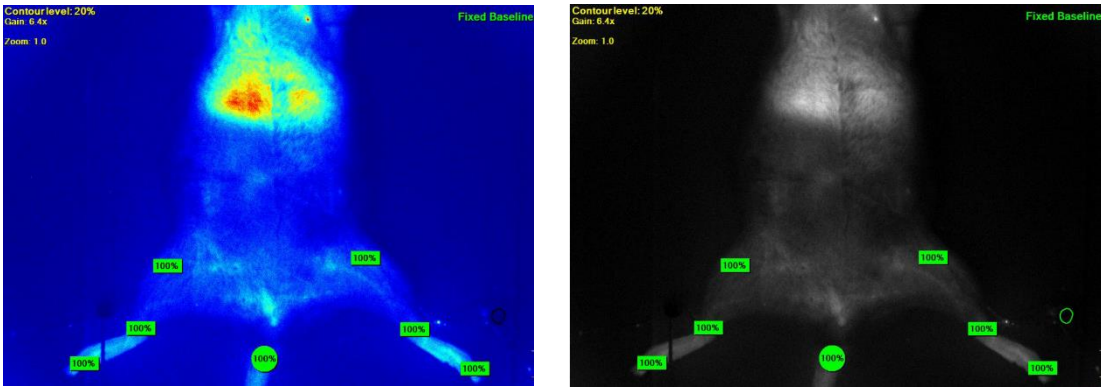
ekstremiteki aynı noktalar ile karşılaştırıldı ve deney gruplarının ortalamaları alınarak sonuçlara göre istatistiksel analizleri yapıldı (Şekil 27).



Şekil 26. ICG, SPY cihazı ve anjiyografik ölçümler için deney modelinin hazırlanması



Şekil 27a. Kontrol grubundaki bir sıçana ait olan SPY görüntüleri



Şekil 27b. Kontrol grubundaki bir sıçana ait olan yüzdelik cinsinden SPY görüntüleri

3.5.3. Patolojik Verilerin Elde Edilmesi

Son olarak deneklerin gastroknemius kasları patolojik değerlendirme amacıyla total olarak alındı ve %10'luk formalin solüsyonunda 48 saat tespit edildikten sonra doku takip cihazında 14 saat doku takip işlemi yapıldı, daha sonra parafine gömülüp, 5 mikronluk kesitler alındı ve I/R çalışmalarında rutin olarak kullanılan Hematoksilen-Eozin ile boyandı. Patolojik preperatlar morfolojik olarak ışık mikroskobunda değerlendirildi. Gastroknemius preperatlarında kas hasarının değerlendirilmesinde; çizgilenme (striasyon) kaybı, periferal çekirdeklerde (nukleuslarda) belirsizlik, nekroz, hücresel şişme, ödem, kapillerde PMNL birikimi, dokuda PMNL birikimi, konjesyon, hemoraji, monosit-makrofaj infiltrasyonu gibi kriterler esas alındı. Gastroknemius kas örnekleri kontrol, iskemi grubu ve gruplar arasında karşılaştırılarak değerlendirmeye alındı. Kesitler patolojik değerlendirme kriterlerine göre yok (0) , hafif (1), orta (2), şiddetli (3) olarak değerlendirildi (Şekil 28).



Şekil 28. Kontrol ve I/R gruplarından gastroknemius kas örneklerinin alınması

3.5.4. İstatistiksel Değerlendirme

Verilerin analizinde Statistical Package for the Social Sciences (SPSS v20) programı kullanıldı. Kategorik değişkenler sayı ve yüzde, numerik değişkenler ise ortalama ve standart sapma olarak sunuldu. Gruplar arası değerlendirmelerde Kruskal Wallis varyans analizi, post-hoc değerlendirmelerde Bonferroni düzeltmeli Mann Whitney U testi ve grup içi değerlendirmelerde ise Wilcoxon testi kullanıldı. Analizlerde istatistiksel anlamlılık düzeyi $p<0.05$ olarak kabul edildi.

4. BULGULAR

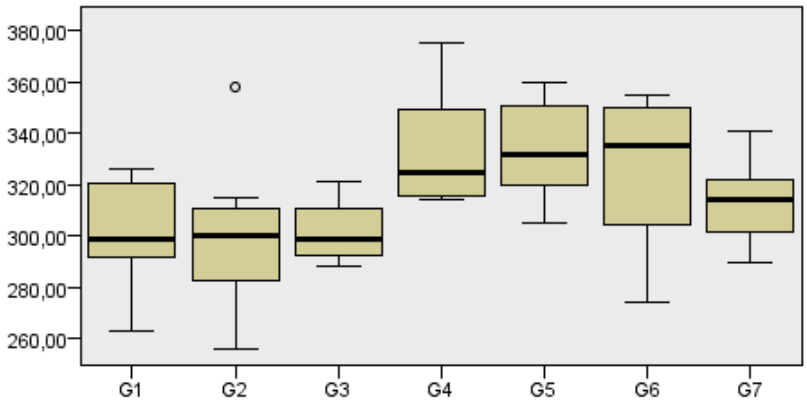
4.1. Vücut Ağırlıkları

Her grupta sekizer adet olmak üzere toplam 56 adet sıçan bulunmakta ve gruplardaki hayvanların vücut ağırlıkları ortalaması 315,64 ± 25,44 idi. Grupların vücut ağırlığı dağılımları benzerdi (p>0,05).

I/R deney modelinde grupların vücut ağırlıklarına ilişkin tanımlayıcı istatistikleri Tablo 2' de ve Şekil 29' da sunuldu.

Tablo 2. Gruplardaki hayvanların vücut ağırlığı tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	301,25 ± 21,00	298,50 (289,25-322,25)
G2	300,25 ± 29,76	300,00 (281,00-313,00)
G3	301,63 ± 11,74	298,50 (290,75-312,50)
G4	333,38 ± 22,20	324,50 (315,25-351,00)
G5	333,75 ± 19,42	331,50 (318,00-354,50)
G6	326,00 ± 29,65	335,00 (298,25-351,00)
G7	313,25 ± 16,60	314,00 (296,75-323,00)



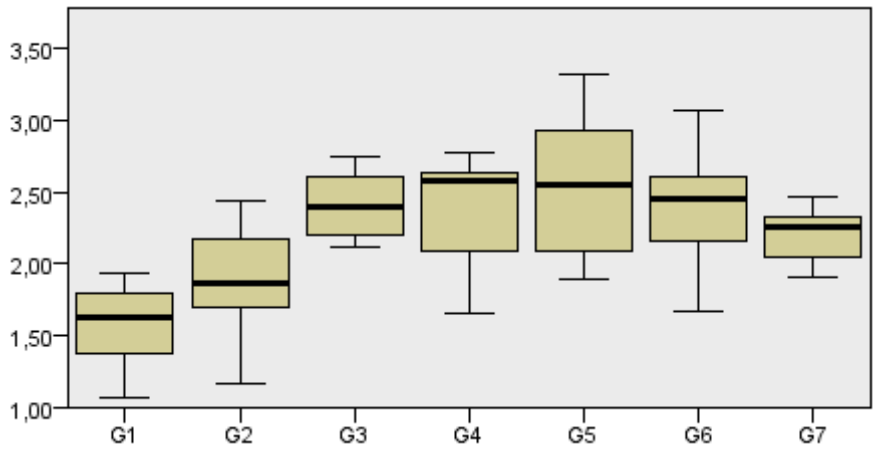
Şekil 29. Gruplardaki ortalama vücut ağırlığı dağılımları

4.2. Gastroknemius Kas Ağırlıkları

Patolojik değerlendirmeler için gruplardaki tüm sıçanların gastroknemius kasları formal ile fikse edilmeden hemen önce hassas terazi ile tartıldı. Gruplardaki hayvanların gastroknemius kas ağırlıkları ortalaması 2,19 ± 0,47 gr olup, istatistiksel olarak G1-G3 ($p<0,001$), G1-G4 ($p=0,001$), G1-G5 ($p<0,001$), G1-G6 ($p=0,001$) arasında gastroknemius ağırlık dağılımları açısından anlamlı düzeyde fark vardı. Gruplardaki hayvanların gastroknemius kas ağırlıklarına ilişkin tanımlayıcı istatistikler Tablo 3' te ve Şekil 30' da sunuldu.

Tablo 3. Gruplardaki hayvanların gastroknemius kas ağırlığı tanımlayıcı istatistikleri

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	1,57 ± 0,30	1,62 (1,27-1,82)
G2	1,88 ± 0,40	1,86 (1,68-2,24)
G3	2,41 ± 0,24	2,40 (2,19-2,63)
G4	2,38 ± 0.39	2,58 (2,03-2,63)
G5	2,54 ± 0,51	2,55 (2,03-3,02)
G6	2,39 ± 0,41	2,45 (2,15-2,62)
G7	2,20 ± 0,19	2,25 (1,98-2,33)



Şekil 30. Gruplardaki ortalama gastroknemius kas ağırlığı dağılımları

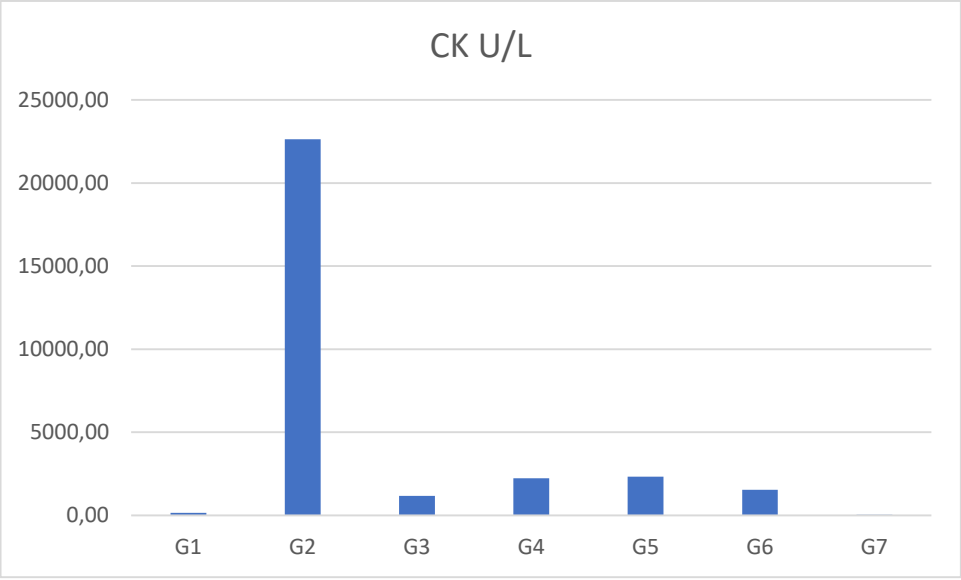
4.3.Biyokimyasal Bulgular

4.3.1. CK Enzim Aktivitesi

CK enzim aktiviteleri ölçümünde, insan CK kiti kullanıldı. Grup 2 de bir, diğer tüm gruplarda ikişer adet sonuç, muhtemel plazma numunelerinin hemolizli olabileceği değerlendirildiğinden hesaplamalarda dikkate alınmadı. CK dağılımlarına bakıldığında; G1-G2 (p=0,002), G2-G7 (p<0,001), G4-G7 (p<0,001), G5-G7 (p=0,001) arasında anlamlı düzeyde fark bulunmaktaydı. Gruplardaki hayvanların CK enzim değerleri dağılımları Tablo 4 ve Şekil 31' de sunuldu.

Tablo 4. Gruplardaki ortalama CK enzim değerleri (U/L cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	144,00 ± 145,18	89,00 (24,25-318,25)
G2	22.621,00 ± 37.278,63	4.347,00 (391,00-52.699,00)
G3	1.175,50 ± 977,45	1.062,50 (161,00-2.276,00)
G4	2.223,50 ± 788,52	2.455,00 (1.262,25-2.946,00)
G5	2.325,17 ± 1.530,57	2.317,50 (990,75-3.939,75)
G6	1.528,33 ± 970,56	1.297,00 (685,50-2.282,50)
G7	26,00 ± 21,11	25,50 (3,50-48,75)



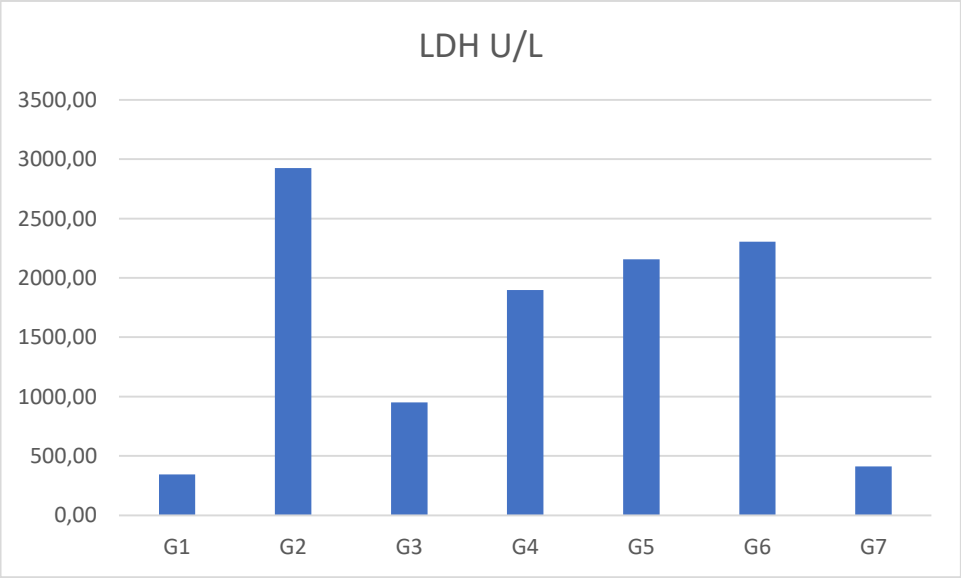
Şekil 31. Gruplardaki ortalama CK enzim değerleri (U/L cinsinden)

4.3.2. LDH Enzim Aktivitesi

LDH enzim aktivitelerinin ölçümünde, insan LDH kiti kullanıldı. Grup 7' nin değerleri sekiz sıçan üzerinden hesaplanırken, Grup 1 ve 2 de birer, Grup 3 ve 5 te ikişer, Grup 4' te üç, Grup 6' da ise dört ölçüm numunesinin hemolizli olabileceği değerlendirildiğinden hesaplamalarda dikkate alınmadı. LDH dağılımlarına göre değerlendirildiğinde; G1-G4 (p=0,001), G1-G5 (p<0,001), G1-G6 (p<0,001), G4-G7 (p=0,002), G5-G7 (p=0,001), G6-G7 (p=0,001) arasında anlamlı düzeyde fark vardı. Gruplardaki hayvanların LDH enzim değerleri dağılımları Tablo 5 ve Şekil 32' de sunuldu.

Tablo 5. Gruplardaki ortalama LDH enzim değerleri (U/L cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q1-Q3)
G1	144,00 ± 145,18	89,00 (24,25-318,25)
G2	22.621,00 ± 37.278,63	4.347,00 (391,00-52.699,00)
G3	1.175,50 ± 977,45	1.062,50 (161,00-2.276,00)
G4	2.223,50 ± 788,52	2.455,00 (1.262,25-2.946,00)
G5	2.325,17 ± 1.530,57	2.317,50 (990,75-3.939,75)
G6	1.528,33 ± 970,56	1.297,00 (685,50-2.282,50)
G7	26,00 ± 21,11	25,50 (3,50-48,75)



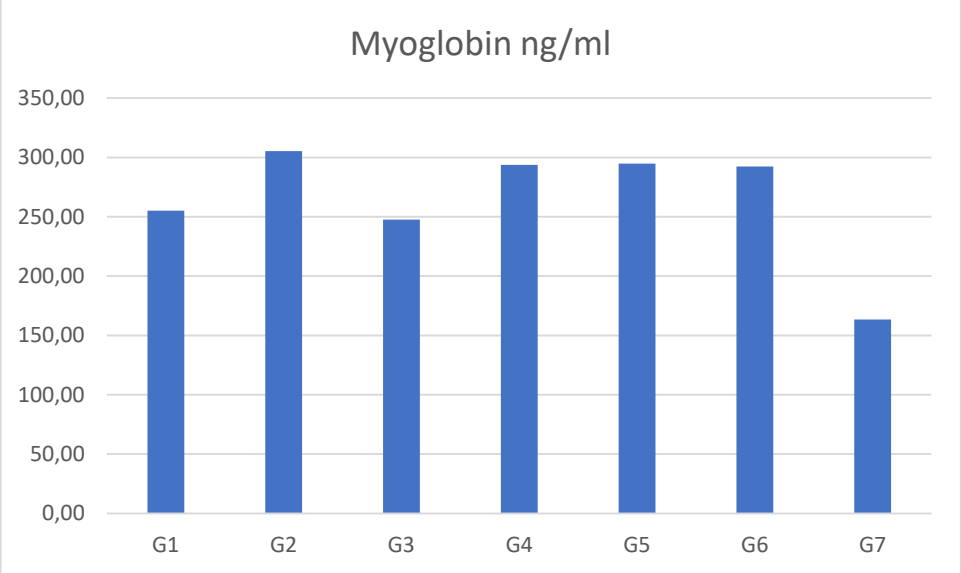
Şekil 32. Gruplardaki ortalama LDH enzim değerleri (U/L cinsinden)

4.3.3. Myoglobin Değerleri

Myoglobin değerleri için, rat myoglobin ELISA ölçüm kiti (Bioassay Technology Labotary, Shanghai, China) kullanıldı. Myoglobin ölçümleri için tüm gruplar sekizer sıçan üzerinden değerlendirildi. Myoglobin değer dağılımlarına bakıldığında; G2-G7 ($p<0,001$), G4-G7 ($p<0,001$), G5-G7 ($p<0,001$) ve G6-G7 ($p<0,001$) arasında anlamlı düzeyde fark bulundu. Myoglobin değerleri dağılımları Tablo 6 ve Şekil 33' de gösterilmiştir.

Tablo 6. Gruplardaki ortalama Myoglobin değerleri (ng/ml cinsinden)

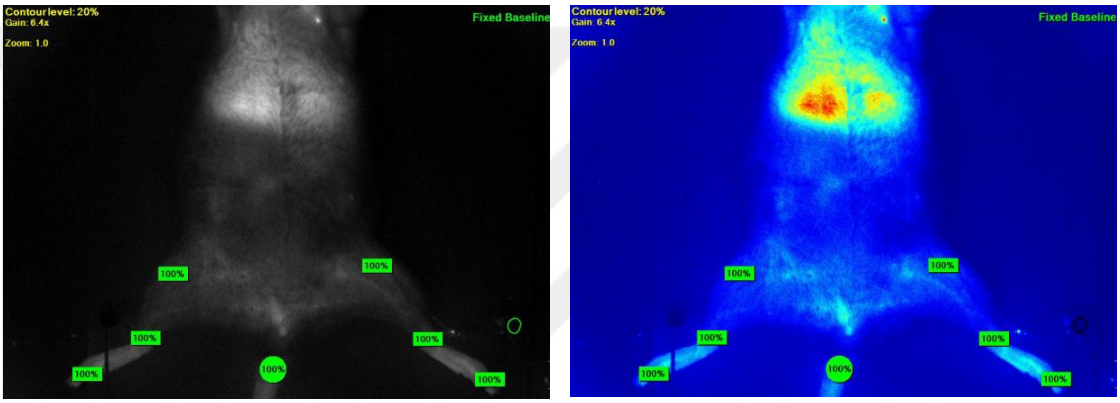
Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	255,06 ± 23,65	254,09 (232,99-273,11)
G2	305,19 ± 35,55	302,05 (280,67-335,01)
G3	247,56 ± 36,63	252,73 (211,17-264,93)
G4	293,57 ± 18,65	293,57 (279,51-293,57)
G5	294,81 ± 31,53	294,81 (267,25-327,22)
G6	292,27 ± 28,35	292,42 (269,10-301,14)
G7	163,30 ± 62,54	141,15 (113,11-227,18)



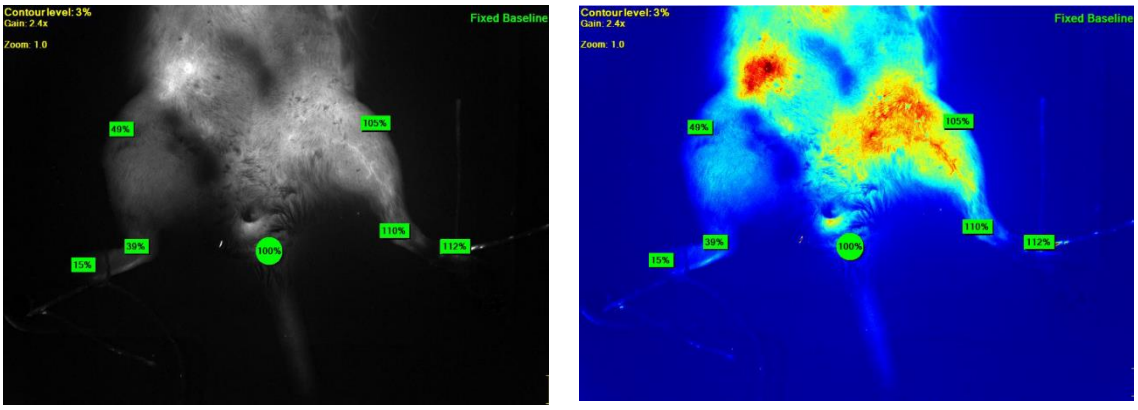
Şekil 33. Gruplardaki ortalama Myoglobin değerleri (ng/ml cinsinden)

4.4.SPY ile Elde Edilen Anjiyografik Bulgular

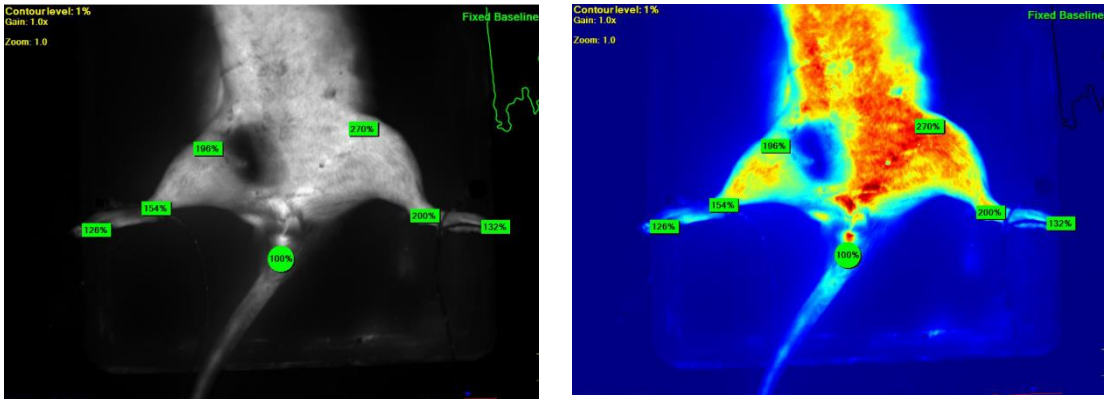
SPY' daki görüntülemeler 90 saniye boyunca saniyede 25 görüntü olacak şekilde kaydedildi. Değerlendirmede tüm sıçanlarda kuyruk ve ekstremite görüntülenmesinin en net olduğu yaklaşık olarak 30. saniyedeki ölçümler kullanıldı. Her bir gruptan birer adet sıçana ait SYP örneği Şekil 34' de sunuldu. Tüm sıçanlarda kuyruk proksimali %100 olarak kabul edildikten sonra, proksimal(trochanter majör), middle(articulatio genu) ve distal (digital falanklar) bölgelere ait ölçümler sağ/sol ekstremitede ayrı ayrı olacak şekilde elde edildi.



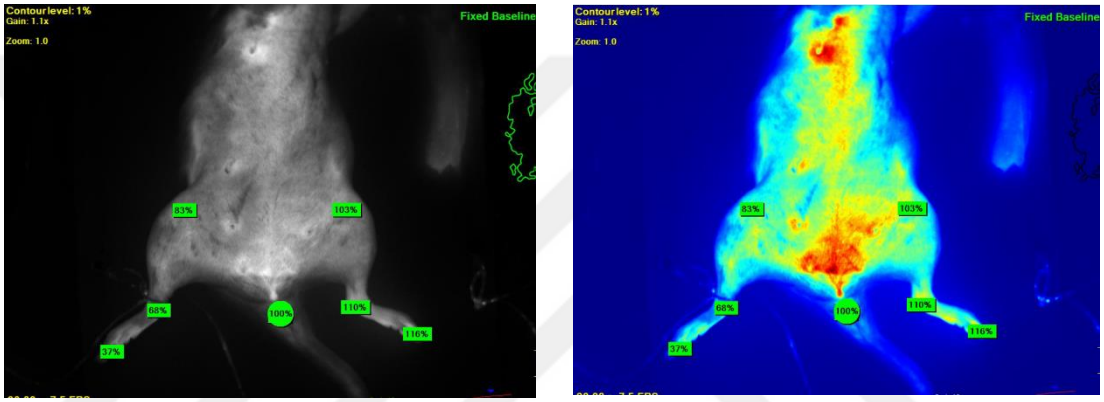
Şekil 34a. Grup 1- Kontrol



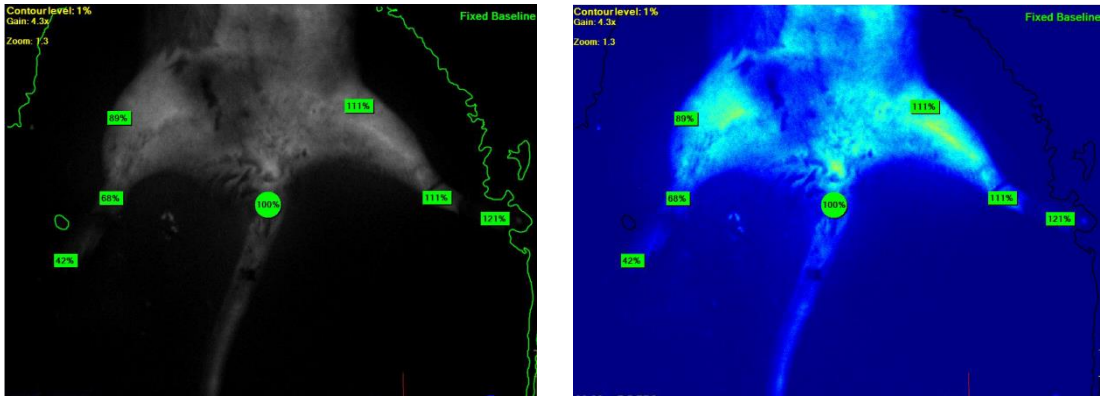
Şekil 34b. Grup 2- I/R



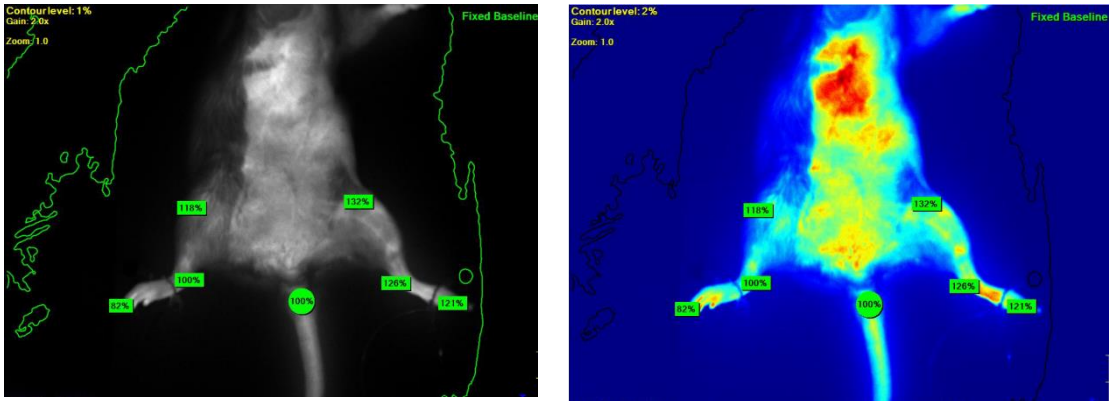
Şekil 34c. Grup 3- I/R+CORM-3



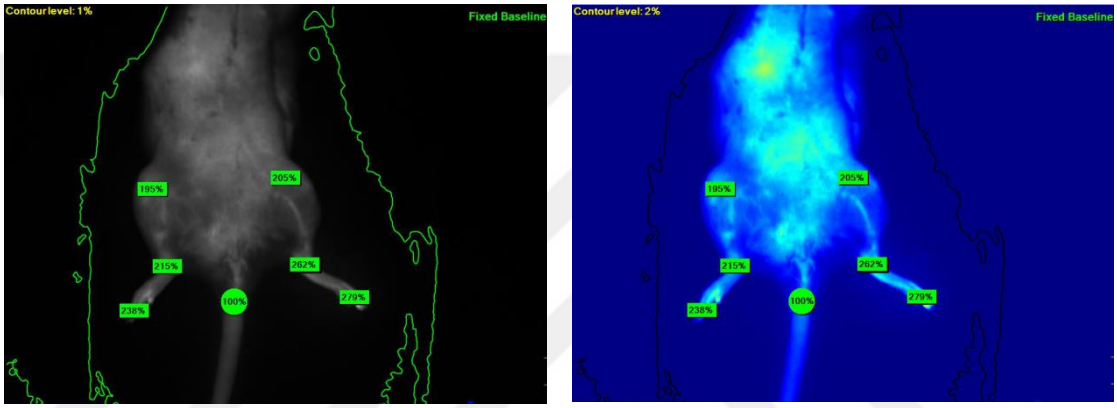
Şekil 34d. Grup 4- I/R+ GbE



Şekil 34e. Grup 5- I/R+ NAC



Şekil 34f. Grup 6- I/R+ Pentoksifilin



Şekil 34g. Grup 7- CORM-3+ I/R

G1 hariç tüm gruplarda sağ/sol perfüzyon dağılımları açısından anlamlı fark vardı. Sağ proksimal SPY değerleri dağılımlarına bakıldığında; G2-G3 ($p<0,001$), G2-G6 ($p<0,001$), G2-G7 ($p<0,001$), G4-G3 ($p<0,001$), G4-G7 ($p<0,001$), G5-G3 ($p=0,002$), G5-G7 ($p<0,001$) arasında anlamlı düzeyde fark vardı. Gruplardaki hayvanların sağ proksimal ekstremite için SPY değerlerinin dağılımı Tablo 7 ve Şekil 35' de sunuldu.

Tablo 7. Sağ proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	101,00 ± 2,44	100,00 (100,00-100,75)
G2	48,25 ± 5,14	49,50 (45,75-50,00)
G3	149,63 ± 40,01	128,50 (117,75-194,00)
G4	74,25 ± 7,40	74,00 (70,00-81,50)
G5	83,63 ± 4,34	82,00 (80,00-88,75)
G6	116,38 ± 2,26	117,50 (114,50-118,00)
G7	185,25 ± 30,47	197,50 (160,50-206,75)

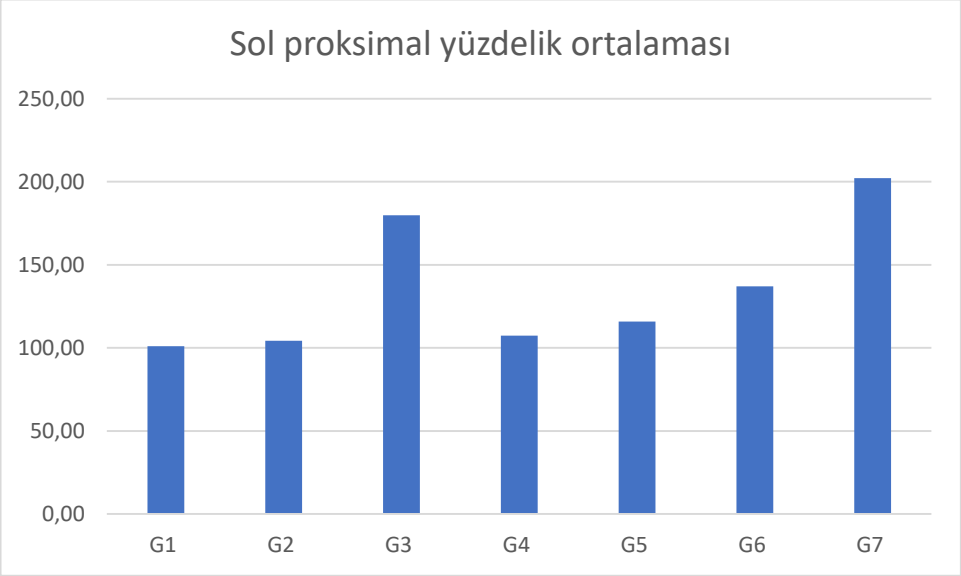


Şekil 35. Sağ proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Sol proksimal SPY değeri dağılımlarına bakıldığında; G1-G3 (p<0,001), G1-G6 (p<0,001), G1-G7 (p<0,001), G2-G3 (p<0,001), G2-G6 (p=0,002), G2-G7 (p<0,001), G4-G3 (p=0,001) ve G4-G7 (p<0,001) arasında anlamlı düzeyde fark bulunuyordu. Sol ekstremite proksimali için SPY değerlerine ilişkin dağılımlar Tablo 8 ve Şekil 36' da sunuldu.

Tablo 8. Sol proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	101,00 ± 2,44	100,00 (100,00-100,75)
G2	104,25 ± 3,01	105,00 (100,75-106,75)
G3	179,88 ± 46,36	183,00 (134,75-203,75)
G4	107,25 ± 2,18	107,00 (106,25-109,00)
G5	115,88 ± 4,39	115,00 (112,00-120,00)
G6	137,00 ± 16,47	134,00 (123,75-142,25)
G7	202,13 ± 31,69	204,50 (182,50-228,75)

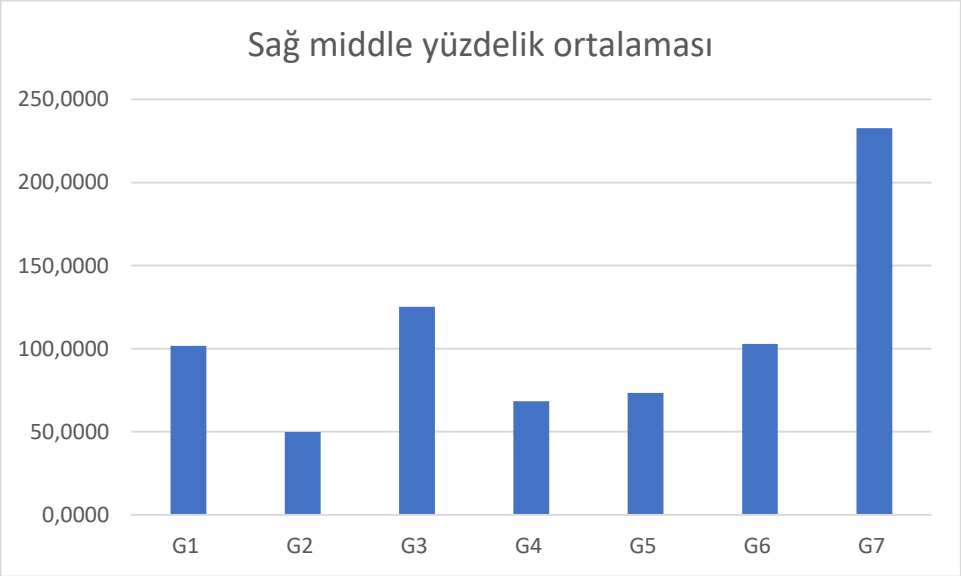


Şekil 36. Sol proksimal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Sağ middle SPY değerlerinin dağılımlarına bakıldığında, G2-G1 (p=0,001), G2-G3 (p<0,001), G2-G6 (p<0,001), G2-G7 (p<0,001), G4-G3 (p<0,001), G4-G7 (p<0,001), G5-G3 (p=0,002) ve G5-G7 (p<0,001) arasında anlamlı düzeyde fark vardı. Sağ ekstremite middle için SPY değerlerine ilişkin dağılımlar Tablo 9 ve Şekil 37' de sunuldu.

Tablo 9. Sağ middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	101,62 ± 4,20	100,00 (100,00-100,75)
G2	49,75 ± 7,95	48,00 (45,00-58,25)
G3	125,25 ± 21,04	117,00 (112,00-145,50)
G4	68,37 ± 3,92	68,50 (68,00-70,00)
G5	73,25 ± 6,38	75,00 (69,50-77,50)
G6	102,75 ± 5,25	100,00 (100,00-104,25)
G7	232,75 ± 49,36	240,50 (215,75-269,50)

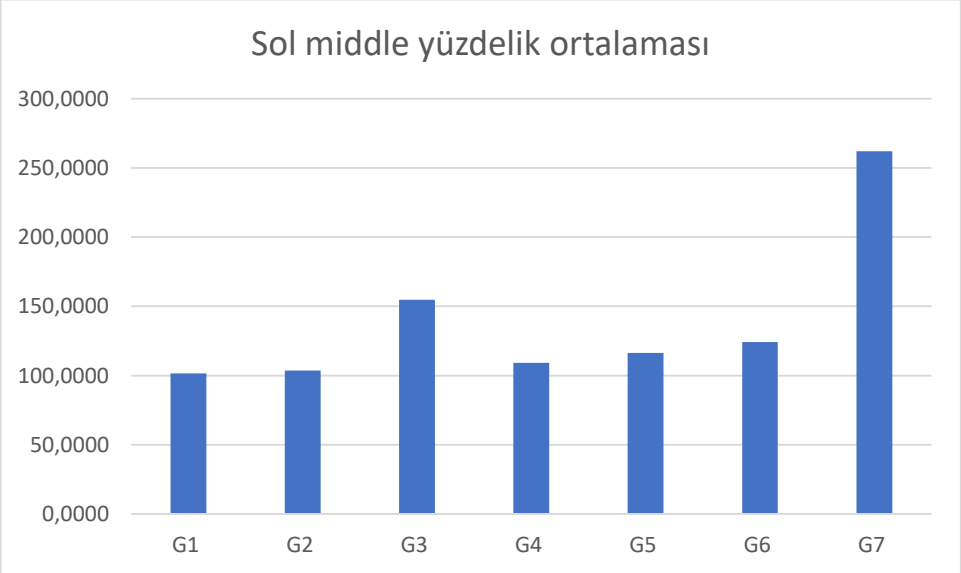


Şekil 37. Sağ middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Sol middle SPY değerlerinin dağılımına bakıldığında, G1-G3 ($p<0,001$), G1-G6 ($p=0,001$), G1-G7 ($p<0,001$) ve G2-G3 ($p<0,001$), G2-G6 ($p=0,002$), G2-G7 ($p<0,001$) ve G4-G3 ($p=0,002$), G4-G7 ($p<0,001$) arasında anlamlı düzeyde fark vardı. Sol ekstremite middle için SPY değerlerine ilişkin dağılımlar Tablo 10 ve Şekil 38' de sunuldu.

Tablo 10. Sol middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	101,62 ± 3,85	100,00 (100,00-101,50)
G2	103,62 ± 4,53	101,00 (100,00-108,75)
G3	154,75 ± 24,92	151,00 (133,00-172,75)
G4	109,12 ± 3,79	108,50 (106,25-113,00)
G5	116,25 ± 4,23	116,50 (112,00-120,00)
G6	124,25 ± 2,25	125,00 (122,00-126,00)
G7	262,00 ± 25,93	268,00 (232,75-284,25)



Şekil 38. Sol middle SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Sağ distal SPY değerlerinin dağılımına bakıldığında, G2-G1 (p<0,001), G2-G3 (p<0,001), G2-G7 ve G4-G1 (P=0,02), G4-G3 (p<0,001), G4-G7 (p<0,001) ve G5-G7 (p<0,001) arasında anlamlı düzeyde fark vardı. Sağ ekstremite distali için SPY değerlerine ilişkin dağılımlar Tablo 11 ve Şekil 39' da sunuldu.

Tablo 11. Sağ distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	103,88 ± 4,85	102,50 (100,00-106,00)
G2	23,50 ± 7,46	24,00 (15,25-30,75)
G3	118,50 ± 26,20	113,00 (100,00-123,75)
G4	35,88 ± 4,15	37,00 (31,50-38,75)
G5	42,25 ± 2,96	42,00 (40,00-44,75)
G6	85,00 ± 10,51	83,00 (80,00-88,00)
G7	234,38 ± 9,03	236,00 (230,00-237,75)

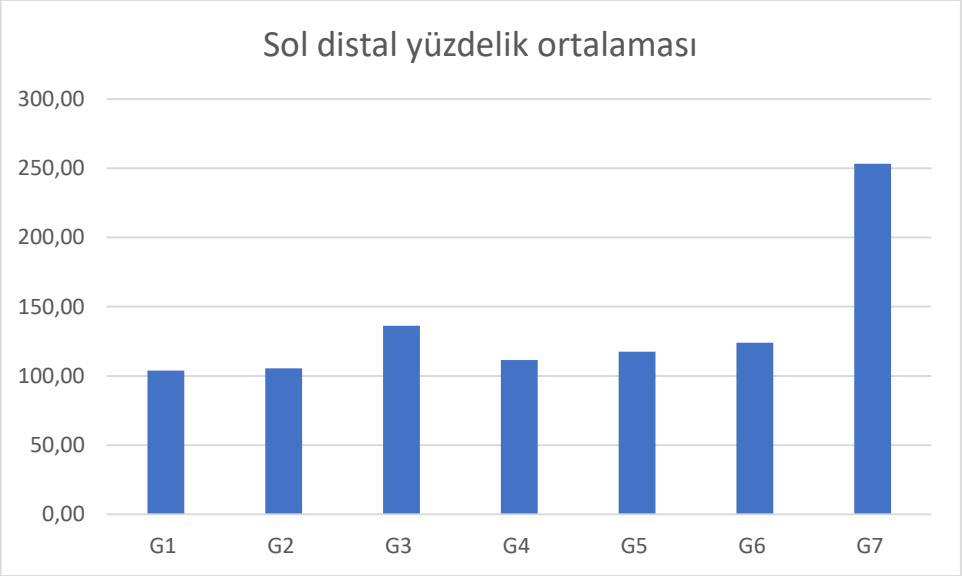


Şekil 39. Sağ distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

Sol distal SPY değerlerinin dağılımına bakıldığında G1-G3 (p<0,001), G1-G6 (p<0,001), G1-G7 (p<0,001) ve G2-G3 (p=0,001), G2-G6 (p=0,001), G2-G7 (p<0,001) ve G4-G7 (p<0,001) anlamlı düzeyde fark vardı. Sağ ekstremite distali için SPY değerlerine ilişkin dağılımlar Tablo 11 ve Şekil 39' da sunuldu.

Tablo 12. Sol distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

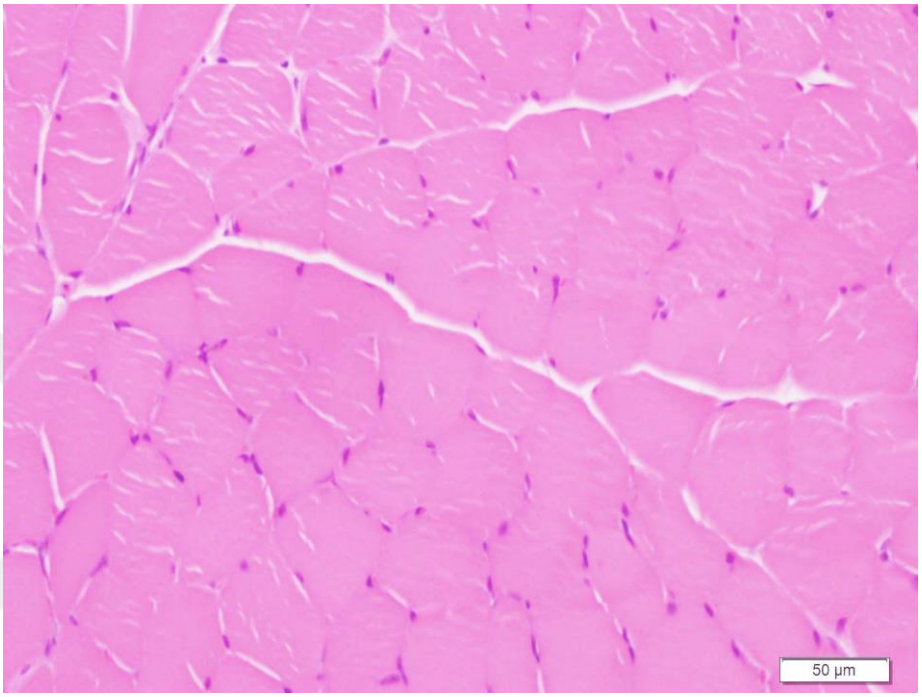
Gruplar	Ortalama ± SS	Ortanca (Q_1-Q_3)
G1	103,88 ± 4,85	102,50 (100,00-106,00)
G2	105,38 ± 5,18	105,00 (100,00-111,25)
G3	136,13 ± 24,63	132,50 (117,75-156,00)
G4	111,50 ± 4,98	111,00 (107,25-116,75)
G5	117,50 ± 3,92	118,50 (113,00-120,75)
G6	124,00 ± 2,72	124,50 (121,25-126,75)
G7	253,25 ± 17,05	254,50 (236,25-266,75)



Şekil 40. Sol distal SPY değerleri (yüzdelik cinsinden)

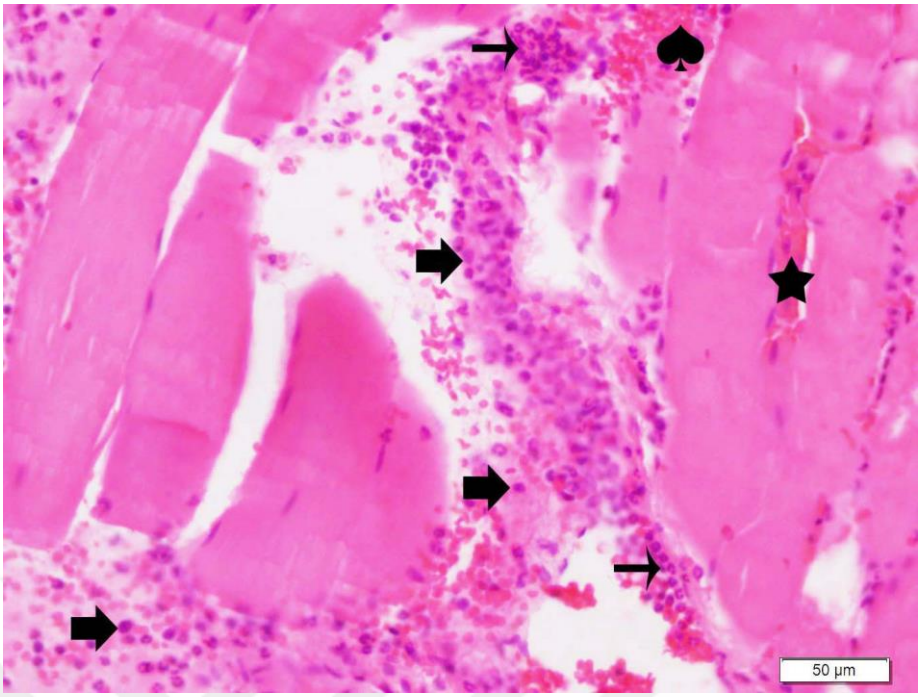
4.5. Patolojik Bulgular

Grup 1 – Kontrol: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kaslarının histopatolojik olarak inceleme sonuçları, ‘’normal histolojik görünüm’’ olarak raporlandı (Şekil 41).

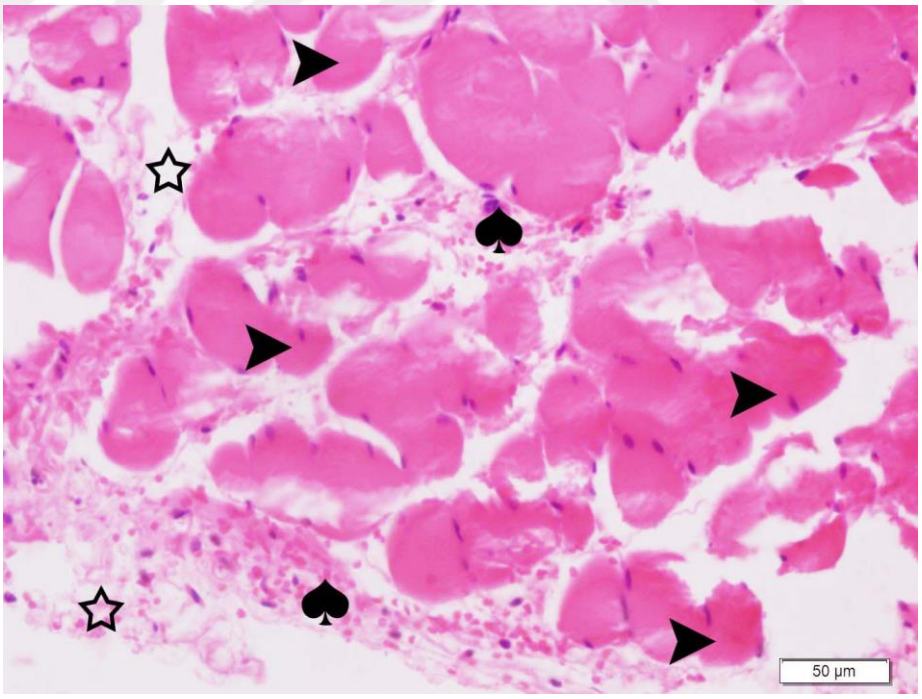


Şekil 41. Gastroknemius kası, normal histolojik görünüm, H&E, Bar: 50µm.

Grup 2 – I/R: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kasları histopatolojik olarak incelendiğinde; kas lifleri arasında çok şiddetli düzeyde hemoraji, konjesyon, perifer nükleuslarda belirsizlik, selüler şişme, mononükleer hücre infiltrasyonları, polimorf hücre infiltrasyonu, perifer nükleuslarda belirsizlik, selüler şişme ve şiddetli düzeyde ödem belirlendi (Şekil 42). Ek olarak kas liflerinde dejenerasyon ve nekroz tespit edildi (Şekil 43).

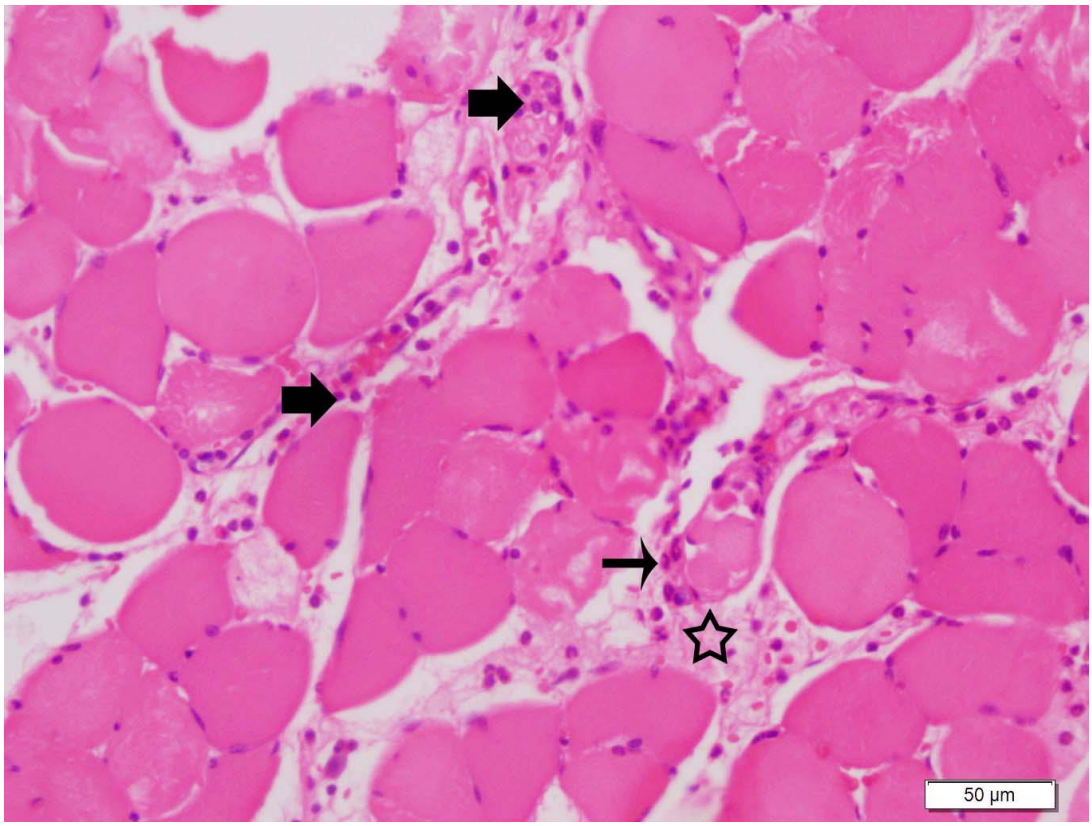


Şekil 42. Grup 2-I/R, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, kas lifleri aralıklarında şiddetli düzeyde, mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın oklar), polimorf hücre infiltrasyonu (ince oklar), konjesyon (yıldız), hemoraji (maça), H&E, Bar: 50µm.



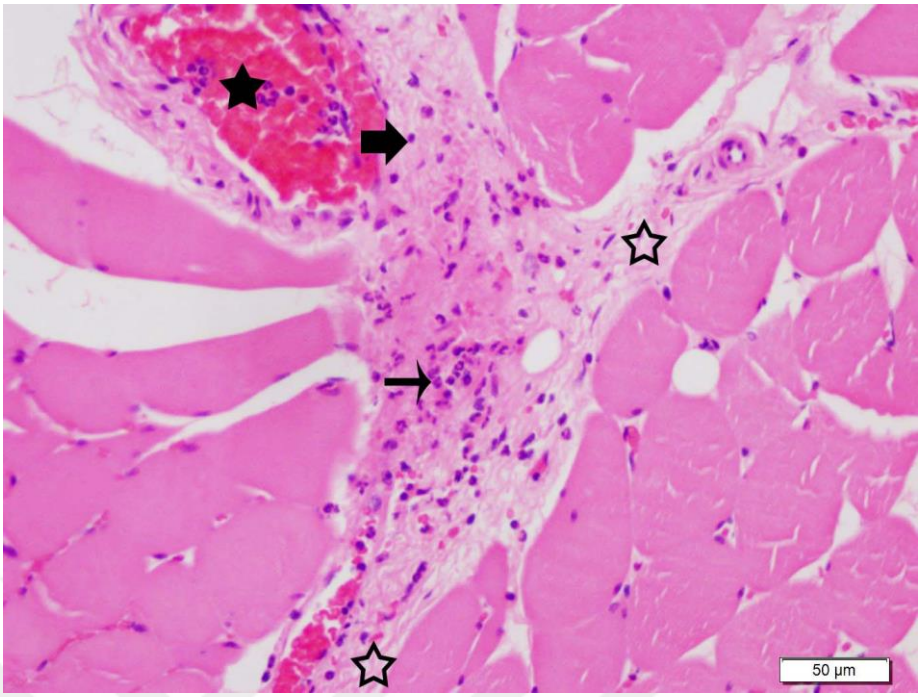
Şekil 43. Grup 2-I/R, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, kas liflerinde nekroz (ok başları), kas lifleri arasında ödem (boş yıldızlar), hemoraji (maçalar), H&E, Bar: 50µm.

Grup 3 – I/R+CORM-3: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kasları histopatolojik olarak incelendiğinde; kas lifleri arasında hafif düzeyde konjesyon, mononükleer/ polimorf hücre infiltrasyonları belirlendi. Hafif düzeyde perifer nükleuslarda belirsizlik ve selüler şişme mevcuttu. Ödem, diğer gruplarla kıyaslandığında G7' deki gibi yok denecek kadar azdı (Şekil 44). IR grubuyla kıyaslandığında anlamlı fark $P<0,05$ tespit edildi.



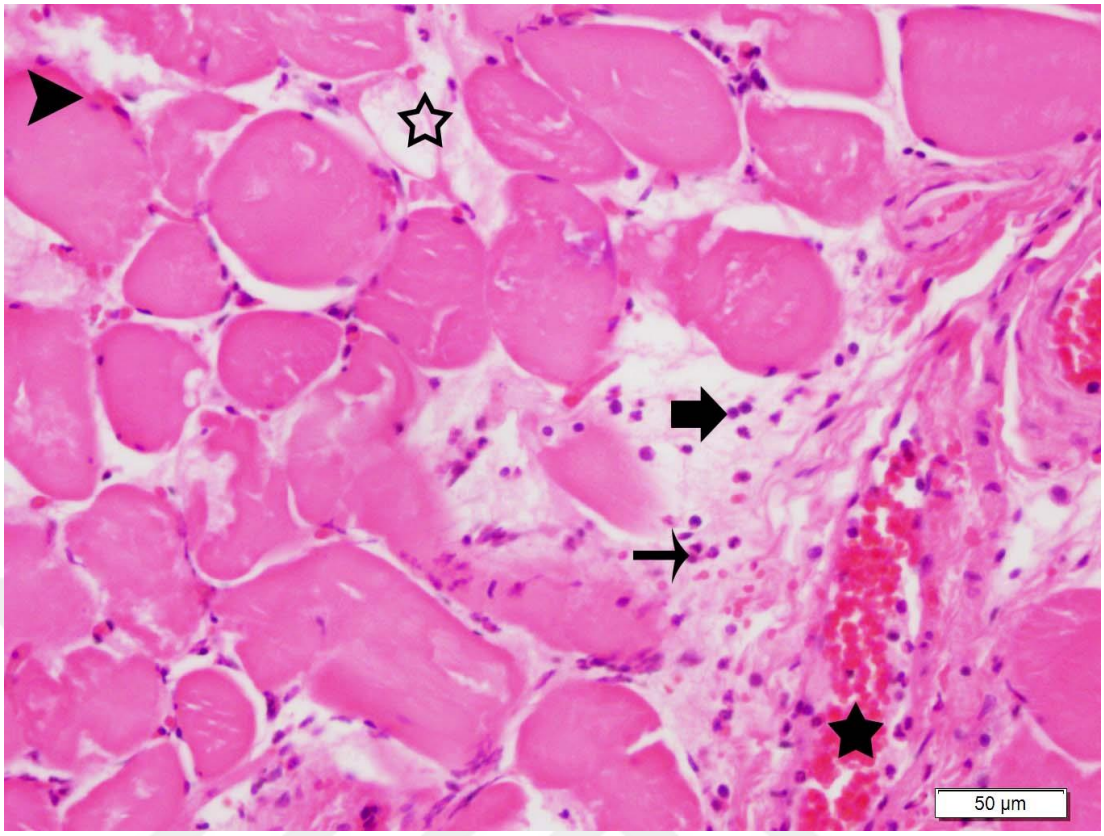
Şekil 44. Grup 3- I/R+CORM3, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın oklar), polimorf hücre infiltrasyonu (ince ok), kas lifleri arasında ödem (boş yıldız), konjesyon, H&E, Bar: 50µm.

Grup 4 – I/R+GbE: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kasları histopatolojik olarak incelendiğinde; kas lifleri arasında orta düzeyde mononükleer hücre infiltrasyonu, hafif düzeyde polimorf hücre infiltrasyonu ve konjesyon tespit edildi. Medikasyon verilen diğer gruplara göre perifer nükleuslarda belirsizlik ve selüler şişme daha şiddetliydi (Şekil 45).



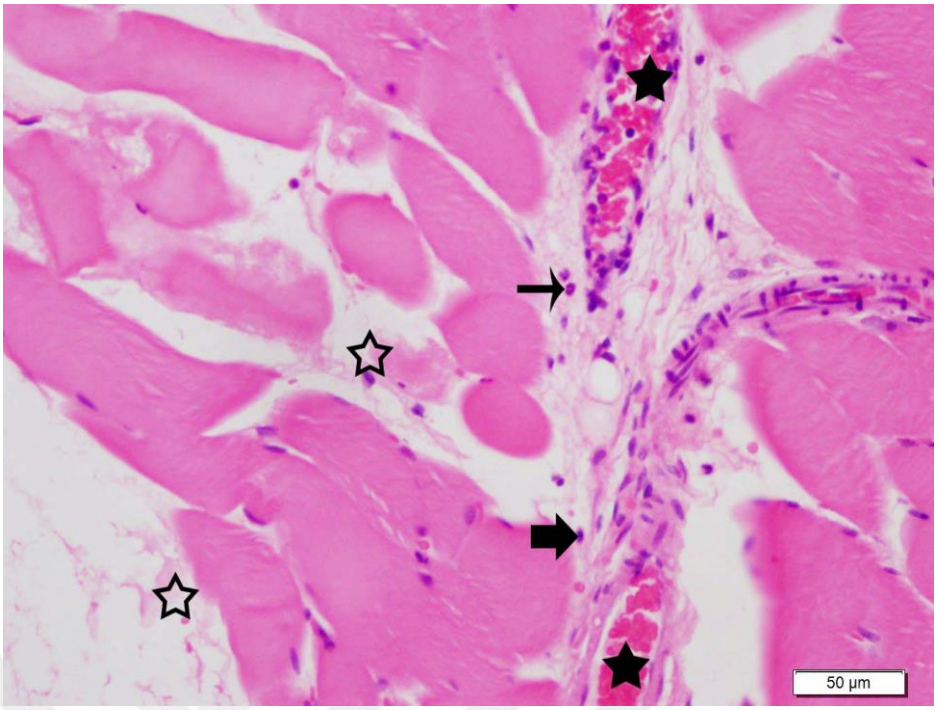
Şekil 45. Grup 4- I/R+GbE, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok), polimorf hücre infiltrasyonu (ince ok), kas lifleri arasında ödem (boş yıldız), konjesyon (yıldız), H&E, Bar: 50µm.

Grup 5 – I/R+NAC: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kasları histopatolojik olarak incelendiğinde; kas lifleri arasında orta şiddette ödem, hafif düzeyde mononükleer/polimorf hücre infiltrasyonu ve konjesyon, perifer nükleuslarda belirsizlik ve selüler şişme ve diğer gruplara göre artmış oranda kas liflerinde nekroz belirlendi **(**Şekil 46).



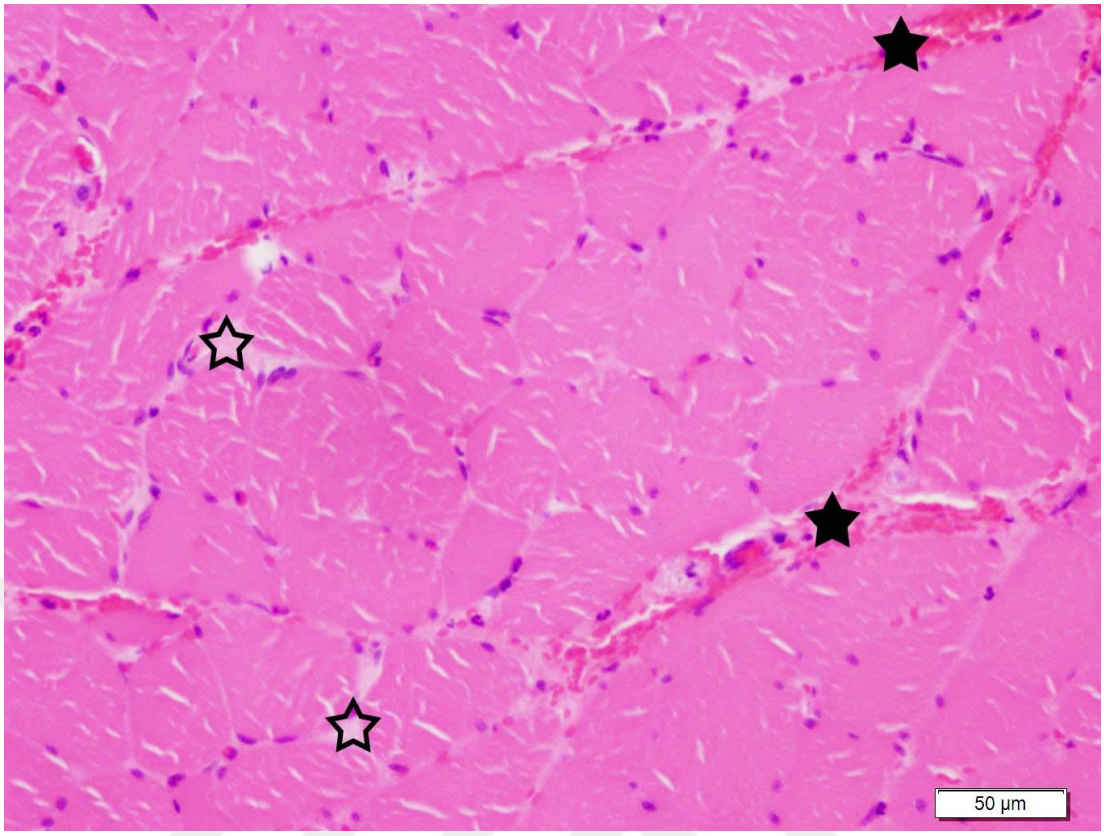
Şekil 46. Grup 5- I/R+NAC grup, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, orta şiddette ödem (boş yıldız), mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok), polimorf hücre infiltrasyonu (ince ok), konjesyon (yıldız), nekroz (ok başı), H&E, Bar: 50µm.

Grup 6 – I/R+Pentoksifilin: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kasları histopatolojik olarak incelendiğinde; kas lifleri arasında çok hafif şiddette ödem, perifer nükleuslarda belirsizlik, selüler şişme, mononükleer/polimorf hücre infiltrasyonu ve damarlarda konjesyon tespit edildi (Şekil 47). I/R grubuyla kıyaslandığında değişikliklerin dağılımı açısından anlamlı fark saptandı ($P<0,05$).



Şekil 47. Grup 6- I/R+Pentoksifilin, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, ödem (boş yıldızlar), mononükleer hücre infiltrasyonu (kalın ok), polimorf hücre infiltrasyonu (ince ok), konjesyon (yıldızlar), H&E, Bar: 50µm.

Grup 7 – Corm 3+I/R grup: Bu grupta bulunan sıçanların gastroknemius kasları histopatolojik olarak incelendiğinde; kas lifleri arasında hafif düzeyde ödem, konjesyon, perifer nükleuslarda belirsizlik ve selüler şişme tespit edildi (Şekil 48). I/R grubuyla kıyaslandığında değişikliklerin dağılımı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark gözlendi ($P<0,05$). Histopatolojik bulgular Tablo 13' de özetlendi.



Şekil 48. Grup 7- CORM3+I/R, gastroknemius kası histopatolojik görünümü, hafif düzeyde ödem (boş yıldızlar), konjesyon (yıldızlar), H&E, Bar: 50µm.

Kesitler patolojik değerlendirme kriterlerine göre yok (0), hafif (1), orta (2), şiddetli (3) olarak sınıflandırıldı. Ki kare analizi için gereklilikleri karşılayacak kadar veri bulunmaması nedeniyle patolojik değerlendirmede kullanılan sınıflama verileri puan olarak kabul edildi ve istatistiksel analizler bu şekilde yürütüldü. Sırasıyla *periferik çekirdeklerde(nukleuslarda) belirsizlik, nekroz, hücresel şişme, ödem, kapillerde PMNL infiltrasyonu, dokuda PMNL infiltrasyonu, konjesyon, hemoraji, monosit-makrofaj infiltrasyonu* kriterlerine göre elde edilen sonuçlar değerlendirildi (Tablo 13).

Tablo 13. Gruplardaki hayvanlarda histopatolojik bulguların dağılımı

Grup		Periferik nükleuslarda belirsizlik	Nekroz	Hücresel şişme	Ödem	Kapiller PMNL infilrasyonu	Doku PMNL infiltrasyonu	Konjesyon	Hemoraji	Monosit/Makrofaj infiltrasyonu
G1	Ort	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Q_1	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Q_3	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
G2	Ort	2,00	2,00	2,00	3,00	3,00	3,00	3,00	1,50	2,00
	Q_1	2,00	2,00	2,00	3,00	2,25	2,25	3,00	1,00	2,00
	Q_3	2,75	2,00	2,75	3,00	3,00	3,00	3,00	2,00	2,00
G3	Ort	1,00	0,50	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	1,00
	Q_1	1,00	0,00	1,00	0,00	1,00	1,00	1,00	0,00	0,25
	Q_3	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	2,00	1,00	1,00
G4	Ort	2,00	0,00	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	0,50	1,00
	Q_1	2,00	0,00	2,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00
	Q_3	2,00	0,75	2,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
G5	Ort	1,00	0,50	1,00	1,00	0,50	1,00	1,00	0,00	1,00
	Q_1	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	1,00	1,00	0,00	1,00
	Q_3	1,75	1,75	1,75	1,00	1,00	1,00	1,00	0,75	1,00
G6	Ort	1,00	0,00	1,00	0,50	0,00	0,50	1,00	0,00	1,00
	Q_1	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
	Q_3	1,75	1,00	1,75	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00	1,00
G7	Ort	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	1,00	0,00	0,00
	Q_1	1,00	0,00	1,00	0,00	0,00	0,00	0,25	0,00	0,00
	Q_3	1,00	0,00	1,00	0,00	0,75	0,75	1,00	0,00	0,00

Ort: Ortanca, Q_1: 1. Kuartil, Q_3: 3. Kuartil

Periferik nükleuslarda belirsizlik kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G1-G4 ($p<0.001$), G1-G5 ($p=0.001$), G1-G6 ($p=0.001$), G3-G2 ($p=0.001$), G7-G2 ($p=0.001$) arasında anlamlı düzeyde fark vardı.

Nekroz kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G7-G2 ($p<0.001$) ve G4-G2 ($p=0.001$) arasında anlamlı düzeyde fark vardır.

Hücresel şişme kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G1-G4 ($p<0.001$), G1-G5 ($p=0.001$), G1-G6 ($p=0.001$), G3-G2 ($p=0.001$), G7-G2 ($p=0.001$), G3-G4 ($p=0.02$), G7-G4 ($p=0.02$) arasında da anlamlı düzeyde fark vardır.

Ödem kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G3-G2 ($p<0.001$), G6-G2 ($p=0.01$), G7-G2 ($p<0.001$) arasında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlendi.

Kapiller PMNL infiltrasyonu kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G4-G2 ($p=0.02$), G5-G2 ($p<0.001$), G6-G2 ($p<0.001$), G7-G2 ($p<0.001$) arasında anlamlı düzeyde fark saptandı.

Dokuda PMNL infiltrasyonu kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G1-G3 ($p=0.02$), G1-G5 ($p=0.01$), G6-G2 ($p<0.001$), G7-G2 ($p<0.001$) arasında anlamlı düzeyde fark olduğu gözlendi.

Konjesyon kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G1-G3($p<0.001$), G1-G5 ($p=0.01$), G1-G6 ($p=0.01$), G4-G2 ($p<0.001$), G5-G2 ($p=0.02$), G6-G2 ($p=0.02$), G7-G2 ($p<0.001$) arasında anlamlı düzeyde fark gözlendi.

Hemoraji kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G3-G2 ($p=0.002$), G5-G2 ($p<0.001$), G6-G2 ($P=0.02$), G7-G2 ($p<0.001$), arasında anlamlı düzeyde fark saptandı.

Monosit/makrofaj infiltrasyonu kriterinin istatistiksel analizi yapıldığında; G1-G2 ($p<0.001$), G6-G2 ($p=0.001$), G7-G2 ($p<0.001$) olmak üzere anlamlı düzeyde fark saptandı.

5. TARTIŞMA

Ekstremitenin akut iskemisi; akut arteryel oklüzyon, periferik vasküler cerrahi, crush travma, periferik vasküler travma ya da ekstremitelerin replantasyonu esnasında karşılaşılan bir durumdur. Ekstremiteye reperfüzyonun tamamen sağlanmasıyla gelişen sistemik inflamatuar yanıt ekstremitenin kaybı, akut böbrek ve solunum yetmezliği, multipl organ disfonksiyonu gibi morbiditeler ve hatta ölümle sonuçlanabilir. Cerrahi müdehalede gecikme ise bu riski daha çok artırır. İskelet kası iskemik hasara en hassas dokulardan birisi olduğu için, alt ekstremite I/R hasarında merkezi bir rolü vardır. Reperfüzyon hasarının prognozu, kas hasarı miktarına bağlıdır (Aksu, Yüksel et al. 2015).

Serbest doku transferi, replantasyonlar gibi mikrocerrahi prosedürler, reperfüzyonun takip ettiği 1.5-4 saat arasında zorunlu iskemik süreyi içerirler. Postrevaskülarizasyon sendromuyla ilişkili olan iskemi; kompartman sendromu, rabdomiyoliz, asidoz, hiperkalsemi, hipovolemik şok, organ yetmezlikleri, amputasyon ve hatta ölüm gibi lokal ve genel komplikasyonlara yol açar. Replante ekstremite ve transplant yapılan kas fonsiyonunun daha iyi restore edilmesi, sadece iskemi süresinin kısa olmasına değil aynı zamanda iskelet kaslarındaki postiskemik reperfüzyon hasarının da minimumda olmasına bağlıdır(Arieli, Nahmany et al. 2008). Plastik cerrahi klinik pratiğinde flep, replantasyon ve transplantasyon uygulamalarında iskelet kaslarında gelişen I/R hasarının tedavisinde henüz cerrahi ya da medikal kür sağlanamaması üzerine mevcut tez çalışması yapılmıştır. Planlanan alt ekstremite I/R modellerinden Strock' un 1969 yılında tanımladığı turnike modeli uygulanarak sıçan alt ekstremite kaslarında iskemi oluşturulmuştur (Strock and Majno 1969). Barie' nin çalışmasında da belirttiği gibi turnike uygulanması, kan akımının tamamen kesildiği ve tam bir iskeminin sağlanabildiği kanıtlanmış tek modeldir (Barie and Mullins 1988). Planlanan özgün I/R modelinin bu çalışmalardan farkı, ekstremitenin en distalinden yani ayak parmaklarından başlanarak, ekstremitenin en proksimaline yani trochanter majöre kadar turnikeyle ekstremitenin tüm kanı boşaltıldıktan sonra, mevcut iskeminin devamının sağlanabilmesi için uzunluğu sabit kilitli kablo bağının eşit miktarda, trochanter majör çentiğine sabitlenmesi ve her bir denekte pediyatrik pulse oksimetre cihazı ile nabız ve saturasyonun olmadığının kontrol edilmesidir.

Reperfüzyon hasarına ilişkin, 2 saatin üzerinde bir reperfüzyon zamanının muskuler lezyonların oluşması için yeterli olduğuna dair literatürde birçok çalışma mevcuttur (Appell, Duarte et al. 1997, da Cruz, Massuda et al. 1997). Literatürde farklı sayılarda iskemi ve daha sonra reperfüzyon süreleri bulunmasına rağmen tarafımızca CORM-3 molekülü hakkında da literatüre katkı sağlanması amacıyla, Bihari ve arkadaşlarından farklı olarak daha az kullanılmış olan 4 saat iskemi ve 4 saat reperfüzyon süresi tercih edilmiştir. CORM-3 ve diğer moleküllerin enjeksiyonunda ise Bihari ve arkadaşlarının yaptığı gibi i.p. yol ilaç enjeksiyonu için kullanıldı (Bihari, Cepinskas et al. 2017).

Biyokimyasal kan numunelerinin alımında Bayramiçli' nin tarif ettiği intrakardiyak yol kullanıldı (Bayramiçli 2005). İskelet kası hasarının belirlenmesi için Rosero, Arieli, Tiryakioğlu ve Murata' nın çalışmalarındaki gibi CK ve LDH, böbrek hasarının takibi amacıyla da Junior' un makalesindeki gibi myoglobin ölçümleri yapıldı (Arieli, Nahmany et al. 2008, Murata, Nozaki et al. 2012, Souza Júnior, Moreira Neto et al. 2013, Rosero, Németh et al. 2014, Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). Anjiyografik görüntülemede için ise literatürde Mücke ve arkadaşlarının sıçan epigastrik fleplerinde femoral vene katater yerleştirerek, insan çalışmalarında ise Beckler ve arkadaşlarının serbest fibula flebinde, Venturi ve arkadaşlarının nipple takibinde, Yang ve arkadaşlarının alt ekstremite ampütasyon takibinde intravenöz yolla, Shih ve arkadaşlarının ise lenfatikovenöz anastomozların takibinde intradermal yolla ICG enjeksiyonunun yapıldığı teknikler mevcuttu (Beckler, Ezzat et al. 2015, Shih, Shakir et al. 2016, Mücke, Fichter et al. 2017, Venturi, Mesbahi et al. 2017, Yang, Hartranft et al. 2018). Biyokimyasal değerlendirmeler için numuneler alındıktan sonra; diğer çalışmalardan farklı olarak alt ekstremite anjiyografisi için deney hayvanlarında ICG enjeksiyonu literatürde ilk defa intrakardiyak yolla yapıldı. Patolojik kriterlerin değerlendirilmesinde ise Tiryakioğlu ve arkadaşlarının akut aortik I/R üzerinde ilioprost ve NAC molekülünün etkilerini incelediği çalışmanın patoloji kriterleri kullanıldı (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). Bu çalışmadan farklı olarak PMNL infiltrasyonu kapillerde ve dokularda ayrı ayrı olacak şekilde incelendi.

CORM-3 molekülünün etkilerinin GbE, NAC ve Pentoksifilin ile karşılaştırıldığı tez çalışmasında sıçanların gastroknemius kas ağırlıklarına bakıldığında Grup 2 ve 7 hariç, tüm grupların Grup 1 yani kontrol grubuyla arasında anlamlı derecede fark vardı. Bu reperfüzyon öncesi yapılan ilaç enjeksiyonlarının makroskobik olarak kas kütlesini artmasını engelleyemediğini, fakat iskemi öncesi yapılan enjeksiyonun ise engelleyebildiğini düşündürdü. CORM-3 dozunun örnek alındığı Bihari' nin makalesinde, GbE dozunun örnek alındığı Sambuy' un makalesinde ve NAC ile Pentoksifilin dozunun örnek alındığı Takhtfooladi' nin makalesinde de enjeksiyonlar reperfüzyon öncesinde yapılmıştı (Sambuy, Costa et al. 2012, Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016, Bihari, Chung et al. 2019). İskemi öncesi Proflaktik CORM-3 molekülünün uygulandığı Grup 7' de bu farkın olmaması, makroskobik olarak kabaca proflaktik CORM-3 kullanımının, küratif CORM-3 kullanımından daha yararlı olabileceğini düşündürebilir; fakat bunun için biyokimyasal, anjiyografik ve patolojik verilerin de aynı üstünlüğü göstermesi şarttır. GbE, NAC ve Pentoksifilin moleküllerinin de proflaktik kullanımlarının küratif kullanımlarıyla karşılaştırılmasıyla bu fark daha iyi anlaşılabilecektir.

I/R hasarının biyokimyasal belirteçleri, mikrocerrahların ve araştırmacıların yıllardır ilgisini çeken bir konu olmuştur. Akut ekstremite iskemisi, bu belirteçlerin konuyla ilgili olduğu bir senaryodur. Biyokimyasal belirteçlerin operasyon öncesi veya sonrası kullanımı, hangi hastaların ekstremitenin kurtarma çabasını tolere edemeyeceğini veya hangi hastanın muazzam çabayla kötü fonksiyonel sonuçları olabileceğini öngörebilir. CK, LDH, myoglobin, laktat, K^+ , bikarbonat ve nötrofil/lökosit oranı mevcut çalışılan belirteçlerden birkaç tanesidir. Günümüzde I/R hasarının en çok çalışılan yönlerinden birisi rabdomiyolizin yol açtığı akut böbrek yetmezliğidir. Akut ekstremite iskemisinde revaskülarizasyonu takiben myoglobinüriyle akut böbrek yetmezliği fenomeni literatürde ilk defa 1960 yılında Haimovici tarafından tanımlanmıştır (Haimovici 1960). Rutin klinik pratiğinde rabdomiyoliz sürecinde en yaygın çalışılan I/R hasarı markeri, CK' dır. Kas iskemisini takiben oluşan reperfüzyon, önemli miktarda miyositten CK gibi myoglobinin de salınmasına yol açar. Aslında serum CK ve Myoglobin yükselmesi kas hasarı derecesini ve hatta I/R hasarından ölümü yansıtan rabdomiyoliz gelişimiyle ilişkilidir. Dikkate alınmalıdır ki, myoglobin direkt olarak akut

böbrek yetmezliğinden sorumlu bir metabolittir. Myoglobinürik böbrek yetmezliği, distal tübüllerde miyoglobin depolanmasının neden olduğu tübüler obstrüksiyonla oluşur. Myoglobin eliminasyonu üriner klirens oranlarının düşük olduğu renal yetmezlikli hastalarda renal fonksiyonların korunması gibi, genellikle glomerüler filtrasyon oranlarından etkilenmez ve myoglobin pik seviyesinin de CK' dan daha hızlı olması vasküler cerrahi hasta popülasyonunda myoglobinin bu yüzden ideal bir marker olmasının sebebidir. Myoglobin, iskelet kaslarında akut ekstremite iskemisinin oluşmasında ve rabdomiyolizde belki anlaşılması ve kullanılması daha fazla kolay olan bir belirteç iken; CK, klinik laboratuarlarda yaygın ulaşılabilirliğinden dolayı rabdomiyolizin indüklediği akut böbrek hasarının tanı ve tedavisinde daha sık takip edilen biyokimyasal belirteçtir ve kas hasarının belirlenmesinde daha sensitiftir. Rabdomiyoliz genellikle serum CK seviyesi 5000 U/L' den fazla olduğu zaman görülmesine rağmen, akut böbrek hasarının indüklediği klinik olarak önemli derecede rabdomyoliz serum CK seviyeleri 10.000-15.000 U/L arasında olduğunda oluşur (Watson, Gifford et al. 2014). Lappalainen ve arkadaşları, CK' nın rabdomyoliz bağlamında incelendiğinde nispeten daha geç pik yapmasının CK' yı iskemi tanısında daha iyi bir belirteç yaptığını, fakat böbrek yetmezliği gelişiminin tahmininde kesin bir CK değeri olmadığı için CK' nın akut böbrek hasarı için uygun bir marker olmadığını belirtmişlerdir (Lappalainen, Tiula et al. 2002). Human CK kiti kullanılan I/R hasarı deney modelinde de CK seviyelerine bakıldığında, Grup 2 yani I/R grubunda CK değerlerinin ortalaması 22.621,00 idi. Reperfüzyon öncesi ilaç enjeksiyonu yapılan tüm gruplarda CK seviyesi 5000 U/L' nin altında bir değerdi. İstatistiksel olarak ise, G7- G2 (Proflaktik CORM-3+ I/R-I/R) arasında ($p<0.001$) olmak üzere anlamlı derece fark mevcuttu. Aynı zamanda G7 ile G4 ve G5 arasında da anlamlı derecede fark mevcuttu. Rat myoglobin ELISA kiti kullanılarak yapılan myoglobin ölçümlerinde ise, yine G7-G2 ($p<0.001$) olmak üzere anlamlı derecede fark vardı. G7 ile G4 ve G5 arasında da yine fark mevcuttu. CORM-3 molekülünün renal I/R' a etkisiyle alakalı Vera ve arkadaşlarının, Kim ve arkadaşlarının böbrek hasarının belirlenmesinde bir diğer belirteç olan plazma kreatinin düzeylerini ölçerek sonuçları anlamlı bulduğu çalışmaları literatürde mevuttur (Kim, Kwak et al. 1998, Vera, Henegar et al. 2005). Vera da yaptığı çalışma sonucunda CORM-3 molekülünün protektif etkisi olduğu sonucuna varmıştı. Alt ekstremite I/R deney modelinde proflaktik CORM-3 medikasyonu alan sıçanların CK ve myoglobin

değerlerinin I/R grubuna göre anlamlı olmasının bir kez daha CORM-3' ün farklı biyokimyasal belirteçlerle rabdomiyoliz ve akut renal hasar tedavisinde etkili olduğunu kanıtlanmış oldu. Vera' nın çalışmasından farklı olarak reperfüzyon öncesi aynı dozlarda CORM-3 tedavisi verilen G3 grubunda CK ve Myoglobin değerleri, G2 grubundan daha düşük olmasına rağmen istatiksel olarak aralarında anlamlı bir fark mevcut değildi. Bu farklılığın ise Vera' nın çalışmasındaki kan örneklerinin reperfüzyondan 24 saat sonra almasından kaynaklanabileceği düşünüldü.

LDH enzim değerleri ortalamasına bakıldığında tedavi ajanlarının kullanıldığı tüm gruplarda LDH değeri G2 yani I/R grubundan daha düşüktü; fakat istatistiksel olarak aralarında anlamlı fark bulunan herhangi bir grup yoktu. Sadece Proflaktik CORM3 kullanılan G7 grubuyla; GbE kullanılan G4, NAC kullanılan G5 ve pentoksifilin kullanılan G6 arasında anlamlı derecede fark mevcuttu. Herhangi bir grupla G2 arasında istatistiksel olarak fark olmaması tüm tedavi ajanlarının LDH enzim değerlerini düşürmekte yetersiz olduğunu düşündürebilir; fakat aynı zamanda G7 grubunun LDH enzim tedavisinde diğer ajanlardan daha etkin olduğu sonucuna da düşündürebilir. Tiryakioğlu ve arkadaşlarının aorta klemp yerleştirerek 1 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon yaptığı bilateral alt ekstremite I/R modelinde NAC kullanılan gruptaki LDH değeri 4786± 313 U/L idi ve bu değer iskemi grubuna göre daha düşük bir değerdi; fakat çalışmamızdaki gibi istatistiksel olarak I/R grubuyla aralarında herhangi bir anlam mevcut değildi (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). İskemi modelleri ve süreleri farklı olsa da NAC molekülünün LDH değerlerini düşürdüğü tez çalışmamızda da gözlendi. Mevcut çalışmada da ilaç tedavisi yapılan gruplarda LDH enzim değerleri düşmesine rağmen, G2 grubuyla aralarında istatistiksel olarak anlamlı fark olmamasının nedeni, hemolizli numunelerden dolayı örneklem grupların küçülmesi de olabilir.

İskemi reperfüzyon hasarının oluşmasında tahmini sonuç karakteristikleriyle spesifik biyokimyasal markerlerin belirlenecek olması, tedavi edici gelişmelere yol gösterecek ve akut I/R hasarında rabdomiyoliz gibi potansiyel biyokimyasal değişikliklerin azaltılmasına yardım edecektir. Bu sadece kısa ve uzun dönem cerrahi sonuçların ilerlemesine değil; aynı zamanda müdehale seçimi ve zamanlamanın daha iyi anlaşılmasına yol açacaktır.

Son yirmi yılda Feindel ve arkadaşlarının mikrocerrahi prosedürlere floresan anjiyografi uygulamasını takiben ICG, rekonstruktif cerrahide rol almaya başlamıştır (Feindel, Yamamoto et al. 1967). Son zamanlarda bu teknik ameliyat mikroskobuyla entegre bir sistem olarak mikrovasküler anastomozu takiben patensin anlık analizi için de uygulanmıştır (Mücke, Fichter et al. 2017). ICG anjiyografiyi takiben kan akımının kalitatif olarak değerlendirilmesi, flep nekrozu veya ampütasyonu takiben güdük nekrozu tahminini optimize etmek için denenmiştir (Zimmermann, Roenneberg et al. 2010, Munabi, Olorunnipa et al. 2014). CORM-3, GbE, NAC ve pentoksifilinin etkinliği literatürde ilk defa ICG kullanılarak karşılaştırıldı. İskemi yapılmayan G1 yani kontrol grubu haricinde tüm gruplarda sağ/sol perfüzyon dağılımları açısından anlamlı düzeyde fark vardı. İskemi yapılmayan ekstremitelerde kontrol grubuna göre perfüzyonun artmış olması Khalil ve arkadaşlarının makalesinde de anlatıldığı gibi iskeminin oluşturduğu inflamasyon sonucu açığa çıkan mediyatörlerin perfüzyonu artırdığını kanıtlamış oldu (Khalil, Aziz et al. 2006). Sağ/sol ekstremite proksimali ve middle bölgesi SPY sonuçları değerlendirildiğinde; G2 yani I/R grubuyla G3(I/R+CORM-3), G6(I/R+pentoksifilin), G7(CORM-3+I/R) arasında anlamlı fark olması CORM-3 ve Pentoksifilin moleküllerinin majör damarların anjiyozom bölgesinde perfüzyonu artırdığını gösterir. Sağ/sol ekstremite distali değerlendirildiğinde ise; iskemi yapılmayan ekstremitede G2 ile G3,G6 ve G7 arasında anlamlı fark mevcut iken, iskemi yapılan ekstremitede G2 ile G3 ve G7 arasında anlamlı fark mevcuttu. Ayrıca iskemi yapılan ve yapılmayan ekstremitelerdeki tüm alanlarda G7 ve G3 grubuyla G4 arasında anlamlı derecede fark mevcuttu. İskemi yapılmayan ekstremitede Pentoksifilin ve CORM-3 moleküllerinin G2 grubuyla arasında anlamlı fark olması iki molekülün de makrovasküler ve mikrovasküler dolaşımda hiperpefüzyon yaptığı anlamına gelebilir. Takhtfooladi' nin de çalışmasında değindiği gibi pentoksifilin molekülü periferik vazodilatör ilaçların çoğundan farklı olarak kanda reolojik etki gösterip, kan vizkositesini azaltarak kan akışkanlığını artırır (Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). Çalışmamızda pentoksifilin molekülünün iskemi yapılmayan ekstremitede hem majör hem minör damar anjiyozom alanlarında perfüzyonu artırırken; iskemi yapılan ekstremitede minor damar anjiyozomunda perfüzyonu artırmasına rağmen istatistiksel olarak bir fark bulunamamıştır. Pipinos ve arkadaşlarının intermittan klaudikasyolu iskelet kaslarında pentoksifilin moleküllerinin özellikle iskemik alanlara

kan akımını artırdığını belirttiği çalışmasından farklı olarak, deney modelimizdeki sonuçlarda pentoksifilinin major arter anjiyozomları için artırıp, minör anjiyozomlar için yetersiz kaldığını düşündürebilir (Boska, Shepard et al. 2002). Ancak bu farklı sonucu bulmamızın sebebi tek seans iskemi ve reperfüzyon yapılması olarak da düşünülebilir. Deney sonuçlarında ayrıca sağ ekstremite middle ve distal seviyesinde G2 yani iskemi grubuyla G1 yani kontrol grubu arasında anlamlı fark bulunması, iskeminin orta ve küçük çaplı arter anjiyozomlarında perfüzyonu artırdığını gösterir. Bu sonuç Khalil ve arkadaşlarının repefüzyon hasarı makalesinde iskemik koşullandırmanın perfüzyonu artırdığına dair görüşlerini doğrulamış oldu. Kontrol yani G1 grubu hariç, tüm gruplarda sağ/sol perfüzyon dağılımları arasında anlamlı fark olması da yine Khalil ve arkadaşlarının çalışmasında da değinildiği gibi iskemik koşullandırmanın global kan akımı perfüzyonunu da artırabileceğini düşündürdü (Khalil, Aziz et al. 2006).

Patolojik incelemelerde ise tüm kriterlerde G7 yani CORM-3+ I/R grubuyla G2 yani I/R grubu arasında anlamlı fark mevcuttu. CORM-3 molekülünün iskemi sonrası ve reperfüzyon öncesi kullanımında ise periferik nükleuslarda belirsizlik, hücresel şişme, ödem ve hemoraji kriterlerinde iskemi grubuyla arasında anlamlı fark mevcuttu. CORM3 molekülünün proflaktik kullanımı hem biyokimyasal, hem anjiyografik ve hem de patolojik inceleme kriterlerinde I/R hasarını tedavi edebildi. CORM3 molekülü tedavi dozunun örnek alındığı Bihari' nin çalışmasında da CORM3 molekülü iskelet kaslarındaki reperfüzyon hasarını geriletebilmişti (Bihari, Cepinskas et al. 2017). Bihari' nin çalışmasından farklı olarak proflaktik CORM-3 kullanımıyla da aynı etkinin olduğu tez çalışmasında kanıtlanmış oldu.

GbE kullanılan G4' te ise nekroz, kapiller PMNL ve konjesyon kriterlerinde G2 ile aralarında anlamlı fark mevcuttu. GbE verilen patoloji preperatlarında hücresel şişme ve periferik nükleuslarda belirsizlik medikasyon verilen diğer gruplara göre daha belirgindi. Literatürde Operpichler ve arkadaşları GbE' nin sıçan hipokampüs hücrelerinde nekrozu geriletebildiğini belirtilmişti, ek olarak iskelet kaslarındaki nekrozu da geriletebildiği tez çalışmasında elde edilen sonuçlardan birisi oldu (Oberpichler, Sauer et al. 1990). Biyokimya, SPY ve patoloji sonuçlarında GbE, iskemi grubundan daha iyi değerlere sahip iken; alt ekstremite I/R modelinde iskelet kası hasarında G2 ile arasında

anlamlı bir fark mevcut değildi. Diamond' ın makalesinde serebrovasküler yetmezlik, Alzheimer demansı, inme, vestibüler bozukluklar gibi nöron kaynaklı hastalıklarda etkili olan GbE alt ekstremite I/R tedavisinde etkili değildi (Diamond, Shiflett et al. 2000). Hem biyokimyasal hem de SPY incelemelerinde G7 yani I/R+CORM3 molekülü grubu ile GbE grubu arasında anlamlı fark olması, CORM-3 molekülünün proflaktik uygulanmasının, iskemi yapılan gruplarda GbE molekülünden daha üstün olduğu sonucuna vardırır. Sambuy ve arkadaşlarının, Bekerecioğlu ve arkadaşlarının kaudal bazlı dorsal fasiyokutan bir flep olan Mc Farlen flebinde GbE molekülünün iskemi üzerine etkisinde anlamlı bir fark bulmalarına karşın, alt ekstremite I/R modelinde sonuçlar iskemi grubuna göre daha iyi olmasına rağmen, iskemi grubuyla arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır (Bekerecioğlu, Tercan et al. 1998, Sambuy, Costa et al. 2012).

NAC molekülü patoloji sonuçlarına göre incelendiğinde; kapiller PMNL infiltrasyonu, konjesyon ve hemoraji kriterlerinde G2 grubuyla arasında anlamlı fark vardı. NAC verilen patoloji preperatlarında nekroz şiddetli bir şekilde görülmüş, bu molekül nekrozu geriletmekte yeteri kadar başarılı olamamıştı. SPY incelemelerinde daha yüksek perfüzyon oranları ve biyokimya sonuçlarında daha düşük enzim değerleri de olmasına rağmen G2 grubuna göre istatistiksel olarak herhangi bir üstünlüğü mevcut değildi. Patolojik kriterlerin referans alındığı Tiryakioğlu ve arkadaşlarının 1 saat iskemi ve 2 saat reperfüzyon uyguladığı aortik I/R deney modelinin kullanıldığı çalışmasında da kapiller PMNL infiltrasyonu, konjesyon ve hemoraji bulguları iskemi grubuna göre daha düşük bulunmuş ve istatistiksel olarak sadece hemoraji kriteriyle arasında anlamlı fark olduğu belirtilmişti (Tiryakioglu, Erkoc et al. 2015). Tez çalışmamızda da benzer sonuçlar elde edilmesine rağmen istatistiksel olarak farklı sonuçların olması deney modeli ve I/R sürelerinin farklı olmasıyla açıklanabilir. Aksu ve arkadaşları 2 saatlik I/R süreli aortik I/R deney modelinde, NAC molekülünün gastroknemius kası patolojisinde TNF- α ve Hipoksi induced faktör 1- α (HIF_1-α) sonuçlarını incelenmiş ve iskemi grubuyla arasında anlamlı düzeyde fark bulunmuştu (Aksu, Yüksel et al. 2015). İskemi modeli, süresi ve deney modelinde turnike açıldıktan sonra infüzyon şekilde NAC uygulaması iki deney modeli arasındaki sonuçların farkını açıklayabilir.

Pentoksifilin molekülünün patoloji sonuçlarına bakıldığında; ödem, kapillerde ve dokuda PMNL birikimi, konjesyon, hemoraji ve monosit/makrofaj değerlendirme kriterlerinde G2 grubu ile arasında anlamlı derecede fark vardı. Ayrıca pentoksifilin verilen deneklerin patoloji preperatlarında inflamasyon medikasyon verilen diğer gruplara göre daha azdı. SPY değerlerinde de G2 grubuyla anlamlı derecede fark olan pentoksifilin molekülünün, biyokimyasal enzim değerleri G2 grubundan daha düşük olmasına rağmen aralarında istatistiksel olarak fark yoktu. Literatürdeki pentoksifilin ve NAC' ın birlikte kullanıldığı çalışmalara bakıldığında; Demir ve arkadaşları NAC' ın reperfüzyon hasarını önlemede etkili olduğunu ancak pentoksifilinin reperfüzyon hasarını engelleyemediğini belirtmişlerdi (Demir and Inal-Erden 1998). Cerqueira ve arkadaşları mezenterik I/R deney modelinde histopatolojik olarak NAC ve pentoksifilinin karşılaştırılmasında, pentoksifilinin daha koruyucu olduğunu ancak splanknik organlara sağlanan kan akımında aralarında herhangi bir farklılık olmadığını belirtmişlerdir (Cerqueira, Hussni et al. 2008). NAC ve pentoksifilin dozlarının örnek alındığı Takhtfooladi ve arkadaşlarının alt ekstremite I/R hasarı deney modelinde histopatolojik olarak AC dokusu incelendiğinde NAC ve pentoksifilin moleküllerinin ayrı ayrı olarak AC dokusunu iskemik hasardan koruyabildiği; ancak kombine kullanımda daha etkili olmadığı belirtilmişti (Takhtfooladi, Hesaraki et al. 2016). Her iki molekülün de incelendiği çalışmalara bakıldığında iskemi süresi, iskemi yapılan doku ve tedavi ajanlarının verilme zamanı aradaki farklılığı açıklayabilir.

İlaç uygulanan gruplarda patoloji sonuçlarına bakıldığında; medikasyon alan gruplarda inflamasyon azalmış fakat ilaçlar hücresel kriterlerin değerlendirildiği patolojiler üzerinde çok fazla etkili olamamıştı. Akut iskemi modelinin çalışılmış olması ve I/R süresinin 4 saat olması inflamasyonu yansıtan kriterlerde etkinin daha fazla olup, hücresel seviyedeki kriterlerde daha az olmasını açıklayabilir.

Literatürde birçok küçük klinik çalışma reperfüzyon hasarının tedavisinde değişken başarı göstermesine rağmen, şu anda I/R hasarı yan etkilerini azaltan iyi derecede doğrulanmış bir farmakolojik tedavi ajanı yoktur.

CORM-3’ ün vazodilatör etkisi iki mekanima aracılığıyla oluşur. Bunlardan birincisi CORM-3’ ün ATP bağımlı K^+ kanallarını aktive ederek vasküler düz kaslarda vazodilatasyona sebep olmasıdır. İkincisi ise CORM-3 molekülünden kolayca ayrılarak serbest hale gelen CO’ nun, cGMP miktarını artırıp bunun sonucunda da NO salınmasıdır. CORM-3’ ün antiinflamatuar, antiapopitotik, antiproliferatif, nöroprotektif, antioksidan ve vazodilatör özellikleri diğer deneysel çalışmalarda ortaya konulmuştur. Yapılan tez çalışmasında da elde edilen biyokimyasal, anjiyografik ve patolojik sonuçlarda proflaktik ve küratif CORM-3 tedavisinin etkili olması, CORM-3 molekülü hakkında ileri deneysel ve klinik çalışmaların yapılması gerekliliğini ortaya koymaktadır.

CO’nun kokusuz, renksiz, toksik etkisi yüksek ve deneysel olarak dokular tarafından kullanım miktarının ölçülmesinin zor olması sebebiyle, deneysel araştırmalarda kullanım kolaylığı oluşması açısından gerekliliği doğmuş ve sonrasında üretilmiş olan CORM, günümüze kadar yapılmış olan çalışmalarda CO’ nun ne kadar faydalı olabileceğini bilimsel veriler ışığında bize göstermiştir. CORM moleküllerinden birisi olan CORM-3 ise suda ve yağda çözünebilir olmasından dolayı canlı ortamlarda daha kolay kullanım olanağı sağlamakta, bunun sonucunda CORM-3 molekülü hakkında deneysel araştırmaların sayısı günden güne artmaktadır.

Yapılan literatür araştırmaları neticesinde, CORM-3’ ün etkinliği ve güvenilirliği hakkında edindiğimiz bilgiler ve yapılan tez çalışmasıyla elde edilen biyokimyasal, anjiyografik ve patolojik verilerden çıkarılan sonuç, CORM-3 ile alakalı klinik çalışmaların bir an önce başlaması gerektiğidir. Alt ekstremite I/R hasarı gibi morbidite ve mortalitesi fazla olan bir klinik patoloji hakında yüz güldürücü sonuçların alınması için CORM-3 gibi tedavi ajanları hakkında daha fazla çalışma yapılması gerekir.

6. SONUÇ ve ÖNERİLER

1. Ekstremitelerin iskemik koşullandırılmasıyla iskemi yapılan ekstremitenin orta ve küçük çaplı damar anjiyozomlarında, iskemi yapılmayan ekstremitenin ise büyük, orta ve küçük damar anjiyozomlarında perfüzyon artışı olur.

2. Ekstremitelerin transplantasyonu ve ampute ekstremitelerin revaskülarizasyonu ya da replantasyonu sonrası elde edilecek lokal ve sistemik başarının bağlı olduğu en önemli faktör, ekstremitenin maruz kaldığı iskemi süresidir.

3. CORM-3 molekülü hem proflaktik hem terapötik dozlarda büyük, orta ve küçük çaplı damar anjiyozomlarında perfüzyonu artırırken; pentoksifilin molekülü terapötik dozlarda büyük ve orta çaplı damar anjiyozomlarında perfüzyonu artırır.

4. CORM-3 ve pentoksifilin molekülü sağlıklı kişilerde reolojik etkilerinden dolayı mikrovasküler ve makrovasküler dolaşımın artırılması için kullanılabilir.

5. Mikrovasküler ve makrovasküler damar hastalıklarında proflaktik CORM-3 tedavisinin etkinliğini gösteren klinik çalışmalara bir an önce başlanılmalıdır.

.

KAYNAKLAR

Abela, C. B. and S. Homer-Vanniasinkham (2003). "Clinical implications of ischaemia-reperfusion injury." Pathophysiology 9(4): 229-240.

Aeba, R., W. A. Killinger, R. J. Keenan, S. A. Yousem, I. Hamamoto, R. L. Hardesty and B. P. Griffith (1992). "Lazaroid U74500A as an additive to University of Wisconsin solution for pulmonary grafts in the rat transplant model." J Thorac Cardiovasc Surg 104(5): 1333-1339.

Ahmed, A. I., N. N. Lasheen and K. M. El-Zawahry (2016). "Ginkgo Biloba Ameliorates Subfertility Induced by Testicular Ischemia/Reperfusion Injury in Adult Wistar Rats: A Possible New Mitochondrial Mechanism." Oxid Med Cell Longev 2016: 6959274.

Akdere, H., E. Tastekin, M. Mericliler and K. M. Burgazli (2014). "The protective effects of Ginkgo biloba EGb761 extract against renal ischemia-reperfusion injury in rats." Eur Rev Med Pharmacol Sci 18(19): 2936-2941.

Akgül, T., A. Ayyildiz, B. Nuhoğlu, E. Karagüzel, E. Oğüş, H. Yağmurdur, H. Ustün and C. Germiyanoğlu (2008). "Ginkgo biloba (EGb 761) usage attenuates testicular injury induced by testicular ischemia/reperfusion in rats." Int Urol Nephrol 40(3): 685-690.

Aksu, V., V. Yüksel, S. Chousein, E. Taştekin, Ş. İşcan, G. Sağiroğlu, S. Canbaz and H. Sunar (2015). "The effects of sildenafil and n-acetylcysteine on ischemia and reperfusion injury in gastrocnemius muscle and femoral artery endothelium." Vascular 23(1): 21-30.

Alper, M., C. Ozek, O. Erdem, M. Denk, L. B. Colen and R. Prewit (2002). "Effects of University of Wisconsin and lactated Ringer's solutions to ischemia-reperfusion injury in isolated cremaster flap." Microsurgery 22(2): 69-73.

Alshehri, A., M. P. Bourguignon, N. Clavreul, C. Badier-Commander, W. Gosgnach, S. Simonet, C. Vayssettes-Courchay, A. Cordi, J. N. Fabiani, T. J. Verbeuren and M. Félétou (2013). "Mechanisms of the vasorelaxing effects of CORM-3, a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule: interactions with eNOS." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 386(3): 185-196.

Appell, H. J., J. A. Duarte, S. Glöser, F. Remião, F. Carvalho, M. L. Bastos and J. M. Soares (1997). "Administration of tourniquet. II. Prevention of postischemic oxidative stress can reduce muscle edema." Arch Orthop Trauma Surg 116(1-2): 101-105.

Arieli, D., G. Nahmany, N. Casap, D. Ad-El and Y. Samuni (2008). "The effect of a nitroxide antioxidant on ischemia-reperfusion injury in the rat in vivo hind limb model." Free Radic Res 42(2): 114-123.

Badem, S., M. Ugurlucan, H. El, M. Sahin, M. Uysal, O. A. Sayin, B. Gurel, M. Basaran, C. Bayindir, U. Alpagut and E. Dayioglu (2014). "Effects of Ginkgo biloba extract on spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats." Ann Vasc Surg 28(5): 1296-1305.

Barie, P. S. and R. J. Mullins (1988). "Experimental methods in the pathogenesis of limb ischemia." J Surg Res 44(3): 284-307.

Baue, A. E. and W. W. McClerkin (1965). "A STUDY OF SHOCK: ACIDOSIS AND THE DECLAMPING PHENOMENON." Ann Surg 161(1): 41-45.

Bayramiçli, M. (2005). Deneysel mikrocerrahi: Temel araştırma, doku ve organ nakli modelleri, Argos.

Beckler, A. D., W. H. Ezzat, R. Seth, V. Nabili and K. E. Blackwell (2015). "Assessment of Fibula Flap Skin Perfusion in Patients Undergoing Oromandibular Reconstruction: Comparison of Clinical Findings, Fluorescein, and Indocyanine Green Angiography." JAMA Facial Plast Surg 17(6): 422-426.

Bekerecioğlu, M., M. Tercan and I. Ozyazgan (1998). "The effect of Gingko biloba extract (Egb 761) as a free radical scavenger on the survival of skin flaps in rats. A comparative study." Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg 32(2): 135-139.
Beyersdorf, F., G. Matheis, S. Krüger, A. Hanselmann, H. G. Freisleben, G. Zimmer and P. Satter (1989). "Avoiding reperfusion injury after limb revascularization: experimental observations and recommendations for clinical application." J Vasc Surg 9(6): 757-766.
Bihari, A., G. Cepinskas, T. L. Forbes, R. F. Potter and A. R. Lawendy (2017). "Systemic application of carbon monoxide-releasing molecule 3 protects skeletal muscle from ischemia-reperfusion injury." J Vasc Surg 66(6): 1864-1871.
Bihari, A., K. A. Chung, G. Cepinskas, D. Sanders, E. Schemitsch and A. R. Lawendy (2019). "Carbon monoxide-releasing molecule-3 (CORM-3) offers protection in an in vitro model of compartment syndrome." Microcirculation 26(7): e12577.
Bilgin-Karabulut, A., E. Ademoğlu, I. Aydin, M. Erer and C. Gökkuşu (2001). "Protective effects of vitamins A and E pretreatment in venous ischemia/reperfusion injury." J Reconstr Microsurg 17(6): 425-429.
Bolcal, C., V. Yildirim, S. Doganci, M. Sargin, A. Aydin, A. Eken, E. Ozal, E. Kuralay, U. Demirkilic and H. Tatar (2007). "Protective effects of antioxidant medications on limb ischemia reperfusion injury." J Surg Res 139(2): 274-279.
Boska, M. D., A. D. Shepard, P. V. Anagnostopoulos and A. Katsamouris (2002). "Pentoxifylline reverses oxidative mitochondrial defect in claudicating skeletal muscle." J Surg Res 102(2): 126-132.
Bozkurt, A. K. (2002). "Alpha-tocopherol (Vitamin E) and iloprost attenuate reperfusion injury in skeletal muscle ischemia/reperfusion injury." J Cardiovasc Surg (Torino) 43(5): 693-696.
Brouard, S., L. E. Otterbein, J. Anrather, E. Tobiasch, F. H. Bach, A. M. Choi and M. P. Soares (2000). "Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis." J Exp Med 192(7): 1015-1026.
Bschorer, R., F. Blake and B. Lisboa (1997). "Free flap transfer and the prevention of endothelial damage." Mund Kiefer Gesichtschir 1(4): 235-238.
Calhoun, K. H., L. Tan and H. Seikaly (1999). "An integrated theory of the no-reflow phenomenon and the beneficial effect of vascular washout on no-reflow." Laryngoscope 109(4): 528-535.
Carmo-Araújo, E. M., M. Dal-Pai-Silva, V. Dal-Pai, R. Cecchini and A. L. Anjos Ferreira (2007). "Ischaemia and reperfusion effects on skeletal muscle tissue: morphological and histochemical studies." Int J Exp Pathol 88(3): 147-154.
Caumartin, Y., J. Stephen, J. P. Deng, D. Lian, Z. Lan, W. Liu, B. Garcia, A. M. Jevnikar, H. Wang, G. Cepinskas and P. P. Luke (2011). "Carbon monoxide-releasing molecules protect against ischemia-reperfusion injury during kidney transplantation." Kidney Int 79(10): 1080-1089.
Cerqueira, N. F., C. A. Hussni, W. B. Yoshida, J. L. Sequeira and C. R. Padovani (2008). "Effects of pentoxifylline and n-acetylcysteine on injuries caused by ischemia and reperfusion of splanchnic organs in rats." Int Angiol 27(6): 512-521.
Cerra, F. B., T. Z. Lajos, M. Montes and J. H. Siegel (1975). "Hemorrhagic infarction: A reperfusion injury following prolonged myocardial ischemic anoxia." Surgery 78(1): 95-104.
Chatterjee, P. K. (2004). "Water-soluble carbon monoxide-releasing molecules: helping to elucidate the vascular activity of the 'silent killer'." Br J Pharmacol 142(3): 391-393.

Cheng, B., W. Wang, L. Lin, F. Li and X. Wang (2011). "The change of the spinal cord ischemia-reperfusion injury in mitochondrial passway and the effect of the Ginkgo biloba extract's preconditioning intervention." Cell Mol Neurobiol 31(3): 415-420.
Cheng, M. H., H. C. Chen, F. C. Wei, L. C. See, H. Y. Lee and C. J. Wang (1999). "Combined ischemic preconditioning and laser Doppler measurement for early division of pedicled groin flap." J Trauma 47(1): 89-95.
Clark, J. E., P. Naughton, S. Shurey, C. J. Green, T. R. Johnson, B. E. Mann, R. Foresti and R. Motterlini (2003). "Cardioprotective actions by a water-soluble carbon monoxide-releasing molecule." Circ Res 93(2): e2-8.
Creager, M. A., J. A. Kaufman and M. S. Conte (2012). "Clinical practice. Acute limb ischemia." N Engl J Med 366(23): 2198-2206.
Cunha, M. S., J. C. da Silva, H. A. Nakamoto and M. C. Ferreira (2005). "Study of warm ischemia followed by reperfusion on a lower limb model in rats: effect of allopurinol and streptokinase." Clinics (Sao Paulo) 60(3): 213-220.
Çevirme, D., T. Adademir, E. Kafalı Başaran, F. Şavluk Ö, A. Elibol, G. Erkanlı Şentürk, H. Akkaya and B. Yılmaz (2018). "Comparison between iloprost and alprostadil for protection against ischemia/reperfusion injury in a rat model." Turk J Med Sci 48(3): 661-669.
da Cruz, C. A., C. A. Massuda, J. Cherri and C. E. Piccinato (1997). "Metabolic alterations of skeletal muscle during ischaemia and reperfusion." J Cardiovasc Surg (Torino) 38(5): 473-477.
Demir, S. and M. Inal-Erden (1998). "Pentoxifylline and N-acetylcysteine in hepatic ischemia/reperfusion injury." Clin Chim Acta 275(2): 127-135.
Diamond, B. J., S. C. Shiflett, N. Feiwel, R. J. Matheis, O. Noskin, J. A. Richards and N. E. Schoenberger (2000). "Ginkgo biloba extract: mechanisms and clinical indications." Arch Phys Med Rehabil 81(5): 668-678.
Diana, J. N. and M. H. Laughlin (1974). "Effect of ischemia on capillary pressure and equivalent pore radius in capillaries of the isolated dog hind limb." Circ Res 35(1): 77-101.
Dick, F., J. Li, M. N. Giraud, C. Kalka, J. Schmidli and H. Tevaearai (2008). "Basic control of reperfusion effectively protects against reperfusion injury in a realistic rodent model of acute limb ischemia." Circulation 118(19): 1920-1928.
Dillon, J. P., A. J. Laing, J. R. Chandler, J. H. Wang, A. McGuinness and H. P. Redmond (2006). "Pravastatin attenuates tourniquet-induced skeletal muscle ischemia reperfusion injury." Acta Orthop 77(1): 27-32.
Dulak, J., A. Józkowicz, R. Foresti, A. Kasza, M. Frick, I. Huk, C. J. Green, O. Pachinger, F. Weidinger and R. Motterlini (2002). "Heme oxygenase activity modulates vascular endothelial growth factor synthesis in vascular smooth muscle cells." Antioxid Redox Signal 4(2): 229-240.
Duranski, M. R., J. J. Greer, A. Dejam, S. Jaganmohan, N. Hogg, W. Langston, R. P. Patel, S. F. Yet, X. Wang, C. G. Kevil, M. T. Gladwin and D. J. Lefer (2005). "Cytoprotective effects of nitrite during in vivo ischemia-reperfusion of the heart and liver." J Clin Invest 115(5): 1232-1240.
Erturk, E., B. Cekic, S. Geze, M. Kosucu, I. Coskun, A. Eroglu, H. Ulusoy, A. Mentese, C. Karahan and S. Kerimoglu (2009). "Comparison of the effect of propofol and N-acetyl cysteine in preventing ischaemia-reperfusion injury." Eur J Anaesthesiol 26(4): 279-284.
Faxon, D. P., R. J. Gibbons, N. A. Chronos, P. A. Gurbel and F. Sheehan (2002). "The effect of blockade of the CD11/CD18 integrin receptor on infarct size in patients with

acute myocardial infarction treated with direct angioplasty: the results of the HALT-MI study." J Am Coll Cardiol 40(7): 1199-1204.
Feindel, W., Y. L. Yamamoto and C. P. Hodge (1967). "Intracarotid fluorescein angiography: a new method for examination of the epicerebral circulation in man." Can Med Assoc J 96(1): 1-7.
Filippo, C. D., M. Perretti, F. Rossi, F. Ferraraccio, R. Motterlini and M. D'Amico (2012). "Acute myocardial infarction in streptozotocin-induced hyperglycaemic rats: protection by a carbon monoxide-releasing molecule (CORM-3)." Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol 385(2): 137-144.
Fu, L., D. X. Zhang, L. M. Zhang, Y. C. Song, F. H. Liu, Y. Li, X. P. Wang, W. C. Zheng, X. D. Wang, C. X. Gui, X. J. Kong and L. Q. Kang (2020). "Exogenous carbon monoxide protects against mitochondrial DNA-induced hippocampal pyroptosis in a model of hemorrhagic shock and resuscitation." Int J Mol Med 45(4): 1176-1186.
Fukui, A. and S. Tamai (1994). "Present status of replantation in Japan." Microsurgery 15(12): 842-847.
Goksin, I., F. Adali, Y. Enli, M. Akbulut, Z. Teke, G. Sackan, E. Ocak and A. V. Ozcan (2011). "The effect of phlebotomy and mannitol on acute renal injury induced by ischemia/reperfusion of lower limbs in rats." Ann Vasc Surg 25(8): 1118-1128.
Gu, X. P., F. T. Xu, Y. Jiang, Y. D. Qiu and Y. T. Ding (2004). "Pyrrolidine dithiocarbamate added to University of Wisconsin solution inhibits reperfusion injury after orthotopic liver transplantation in rats." Ann Clin Lab Sci 34(2): 187-194.
Gurtner, G. C., P. C. Neligan, R. J. Warren and A. Van Beek (2012). Plastic Surgery: Principles, Elsevier Saunders.
Haimovici, H. (1960). "Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria: evaluation of a hitherto unreported syndrome with report of two cases." Surgery 47: 739-747.
Hall, J. E. (2015). Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology E-Book, Elsevier Health Sciences.
Hataya, Y., K. Matsuo, M. Ishigaki, Y. Imai and K. Taki (1999). "Retrograde intra-arterial infusion of prostaglandin E1 and heparin for the no-reflow phenomenon after oromandibular reconstruction with a free fibular flap." Ann Plast Surg 42(1): 92-95.
https://www.adooq.com/corm-3.html. from https://www.adooq.com/corm-3.html.
https://www.drugs.com/pro/pentoxifylline.html.
https://www.mz-store.com. (2020). "chemical formulation of N-acetyl l-cysteine ", from https://www.mz-store.com/blog/9270-2/.
Jin, G., X. R. He and L. P. Chen (2014). "The protective effect of ginko bilboa leaves injection on the brain dopamine in the rat model of cerebral ischemia/reperfusion injury." Afr Health Sci 14(3): 725-728.
Kaide, J. I., F. Zhang, Y. Wei, H. Jiang, C. Yu, W. H. Wang, M. Balazy, N. G. Abraham and A. Nasjletti (2001). "Carbon monoxide of vascular origin attenuates the sensitivity of renal arterial vessels to vasoconstrictors." J Clin Invest 107(9): 1163-1171.
Kanter, M. (2011). "Protective effects of Ginkgo biloba (EGb 761) on testicular torsion/detorsion-induced ischemia-reperfusion injury in rats." Exp Mol Pathol 91(3): 708-713.
Karaavcı, N. Ç. (2017). Deneysel Subaraknoid Kanama Modelinde Karbonmonoksit Releasing Molekül-3' ün Serebral Vazospazm Üzerine Etkisinin Değerlendirilmesi Tıpta Uzmanlık Tezi Atatürk Üniversitesi.
Kayaalp, S. O. (2012). Akılcı tedavi yönünden tıbbi farmakoloji, Pelikan Yayıncılık.

Keles, M. S., N. Demirci, A. Yildirim, S. S. Atamanalp and K. Altinkaynak (2008). "Protective effects of N-acetylcysteine and Ginkgo biloba extract on ischaemia-reperfusion-induced hepatic DNA damage in rats." Clin Exp Med 8(4): 193-198.
Khalil, A. A., F. A. Aziz and J. C. Hall (2006). "Reperfusion injury." Plast Reconstr Surg 117(3): 1024-1033.
Kharbanda, R. K., U. M. Mortensen, P. A. White, S. B. Kristiansen, M. R. Schmidt, J. A. Hoschtitzky, M. Vogel, K. Sorensen and A. N. Redington (2002). "Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo." Circulation 106(23): 2881-2883.
Khouri, R. K., B. C. Cooley, A. R. Kunselman, J. R. Landis, P. Yeramian, D. Ingram, N. Natarajan, C. O. Benes and C. Wallemark (1998). "A prospective study of microvascular free-flap surgery and outcome." Plast Reconstr Surg 102(3): 711-721.
Khouri, R. K., R. Sherman, H. J. Buncke, Jr., A. M. Feller, S. Hovius, C. O. Benes, D. M. Ingram, N. N. Natarajan, J. W. Sherman, P. D. Yeramian and B. C. Cooley (2001). "A phase II trial of intraluminal irrigation with recombinant human tissue factor pathway inhibitor to prevent thrombosis in free flap surgery." Plast Reconstr Surg 107(2): 408-415; discussion 416-408.
Kim, S. Y., J. S. Kwak, J. P. Shin and S. H. Lee (1998). "The protection of the retina from ischemic injury by the free radical scavenger EGb 761 and zinc in the cat retina." Ophthalmologica 212(4): 268-274.
Knight, K. R., K. MacPhadyen, D. A. Lepore, P. A. Eadie and B. M. O'Brien (1991). "Enhancement of ischaemic rabbit skin flap survival with the antioxidant and free-radical scavenger N-acetylcysteine." Clin Sci (Lond) 81(1): 31-36.
Koksal, C., A. K. Bozkurt, G. Sirin, D. Konukoglu and N. Ustundag (2004). "Aprotinin ameliorates ischemia/reperfusion injury in a rat hind limb model." Vascul Pharmacol 41(4-5): 125-129.
Kroll, S. S., M. J. Miller, G. P. Reece, B. J. Baldwin, G. L. Robb, B. P. Bengtson, M. D. Phillips, D. Kim and M. A. Schusterman (1995). "Anticoagulants and hematomas in free flap surgery." Plast Reconstr Surg 96(3): 643-647.
Kumada, Y., T. Takahashi, H. Shimizu, R. Nakamura, E. Omori, K. Inoue and H. Morimatsu (2019). "Therapeutic effect of carbon monoxide-releasing molecule-3 on acute lung injury after hemorrhagic shock and resuscitation." Exp Ther Med 17(5): 3429-3440.
Kumar, V., A. K. Abbas and J. C. Aster (2017). Robbins Basic Pathology E-Book, Elsevier Health Sciences.
Kuzon, W. M., Jr., P. M. Walker, D. A. Mickle, K. A. Harris, B. R. Pynn and N. H. McKee (1986). "An isolated skeletal muscle model suitable for acute ischemia studies." J Surg Res 41(1): 24-32.
Küntscher, M. V., E. U. Schirmbeck, H. Menke, E. Klar, M. M. Gebhard and G. Germann (2002). "Ischemic preconditioning by brief extremity ischemia before flap ischemia in a rat model." Plast Reconstr Surg 109(7): 2398-2404.
Kvist, M., L. Jozsa, P. Kannus, J. Isola, T. Vieno, M. Järvinen and M. Lehto (1991). "Morphology and histochemistry of the myotendineal junction of the rat calf muscles. Histochemical, immunohistochemical and electron-microscopic study." Acta Anat (Basel) 141(3): 199-205.
Labosky, D. A. (1991). "Selective heparinization of venous anastomosis in latissimus dorsi free flaps to cover lower-extremity soft-tissue defects." Microsurgery 12(4): 301-307.

Land, W., H. Schneeberger, S. Schleibner, W. D. Illner, G. Rutili, K. E. Arfors and K. Messmer (1994). "The beneficial effect of human recombinant superoxide dismutase on acute and chronic rejection events in recipients of cadaveric renal transplants." Transplantation 57(2): 211-217.
Lappalainen, H., E. Tiula, L. Uotila and M. Mänttäri (2002). "Elimination kinetics of myoglobin and creatine kinase in rhabdomyolysis: implications for follow-up." Crit Care Med 30(10): 2212-2215.
Lawendy, A. R., A. Bihari, D. W. Sanders, R. F. Potter and G. Cepinskas (2014). "The severity of microvascular dysfunction due to compartment syndrome is diminished by the systemic application of CO-releasing molecule-3." J Orthop Trauma 28(11): e263-268.
Lejay, A., S. Paradis, A. Lambert, A. L. Charles, S. Talha, I. Enache, F. Thaveau, N. Chakfe and B. Geny (2018). "N-Acetyl Cysteine Restores Limb Function, Improves Mitochondrial Respiration, and Reduces Oxidative Stress in a Murine Model of Critical Limb Ischaemia." Eur J Vasc Endovasc Surg 56(5): 730-738.
Lepore, D. A., K. R. Knight, S. Bhattacharya, M. Ritz, S. P. Robbins, P. Sieg, W. A. Morrison and B. M. O'Brien (1994). "Drug mixture which improves survival of ischemic rabbit epigastric skin flaps." Microsurgery 15(10): 685-692.
Li, T., Y. Zhang, J. Tian, L. Yang and J. Wang (2019). "Ginkgo biloba Pretreatment Attenuates Myocardial Ischemia-Reperfusion Injury via mitoBK(Ca)." Am J Chin Med 47(5): 1057-1073.
Li, W., Z. Luo, X. Liu, L. Fu, Y. Xu, L. Wu and X. Shen (2015). "Effect of Ginkgo biloba extract on experimental cardiac remodeling." BMC Complement Altern Med 15: 277.
Li, X., B. C. Cooley, J. D. Fowler and J. S. Gould (1995). "Intravascular heparin protects muscle flaps from ischemia/reperfusion injury." Microsurgery 16(2): 90-93.
Liu, K. X., W. He, T. Rinne, Y. Liu, M. Q. Zhao and W. K. Wu (2007). "The effect of ginkgo biloba extract (EGb 761) pretreatment on intestinal epithelial apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats: role of ceramide." Am J Chin Med 35(5): 805-819.
Liu, Y. L., Y. Zhou, L. Sun, J. T. Wen, S. J. Teng, L. Yang and D. S. Du (2014). "Protective effects of Gingko biloba extract 761 on myocardial infarction via improving the viability of implanted mesenchymal stem cells in the rat heart." Mol Med Rep 9(4): 1112-1120.
MacNee, W., M. M. Bridgeman, M. Marsden, E. Drost, S. Lannan, C. Selby and K. Donaldson (1991). "The effects of N-acetylcysteine and glutathione on smoke-induced changes in lung phagocytes and epithelial cells." Am J Med 91(3c): 60s-66s.
Maeda, M., A. Fukui and S. Tamai (1991). "Combined therapy with antithrombotic agents and radical scavengers for reperfusion injury of flaps." J Reconstr Microsurg 7(3): 233-243.
Mäkitie, J. and H. Teräväinen (1977). "Histochemical studies of striated muscle after temporary ischemia in the rat." Acta Neuropathol 37(2): 101-109.
Mathes, S. J. and V. R. Hentz (2006). Plastic Surgery, Saunders Elsevier.
Matsuo, K., H. Kushima, M. Noguchi, Y. Sakaguchi and T. Fujiwara (1992). "Continuous intraarterial infusion of prostaglandin E1 and heparin to extend and improve the survival of pedicled musculocutaneous flaps through unusual routes: a clinical preliminary report." Ann Plast Surg 29(4): 314-320.
May, J. W., Jr., L. A. Chait, B. M. O'Brien and J. V. Hurley (1978). "The no-reflow phenomenon in experimental free flaps." Plast Reconstr Surg 61(2): 256-267.

Morisaki, H., T. Katayama, Y. Kotake, M. Ito, M. Handa, Y. Ikeda, J. Takeda and M. Suematsu (2002). "Carbon monoxide modulates endotoxin-induced microvascular leukocyte adhesion through platelet-dependent mechanisms." Anesthesiology 97(3): 701-709.
Morse, D. and J. Sethi (2002). "Carbon monoxide and human disease." Antioxid Redox Signal 4(2): 331-338.
Munabi, N. C., O. B. Olorunnipa, D. Goltsman, C. H. Rohde and J. A. Ascherman (2014). "The ability of intra-operative perfusion mapping with laser-assisted indocyanine green angiography to predict mastectomy flap necrosis in breast reconstruction: a prospective trial." J Plast Reconstr Aesthet Surg 67(4): 449-455.
Murata, I., R. Nozaki, K. Ooi, K. Ohtake, S. Kimura, H. Ueda, G. Nakano, K. Sonoda, Y. Inoue, H. Uchida, I. Kanamoto, Y. Morimoto and J. Kobayashi (2012). "Nitrite reduces ischemia/reperfusion-induced muscle damage and improves survival rates in rat crush injury model." J Trauma Acute Care Surg 72(6): 1548-1554.
Mücke, T., A. M. Fichter, L. H. Schmidt, D. A. Mitchell, K. D. Wolff and L. M. Ritschl (2017). "Indocyanine green videoangiography-assisted prediction of flap necrosis in the rat epigastric flap using the flow(®) 800 tool." Microsurgery 37(3): 235-242.
Nakao, A., K. Kimizuka, D. B. Stolz, J. Seda Neto, T. Kaizu, A. M. Choi, T. Uchiyama, B. S. Zuckerbraun, A. J. Bauer, M. A. Nalesnik, L. E. Otterbein, D. A. Geller and N. Murase (2003). "Protective effect of carbon monoxide inhalation for cold-preserved small intestinal grafts." Surgery 134(2): 285-292.
Oberpichler, H., D. Sauer, C. Rossberg, H. D. Mennel and J. Krieglstein (1990). "PAF antagonist ginkgolide B reduces postischemic neuronal damage in rat brain hippocampus." J Cereb Blood Flow Metab 10(1): 133-135.
Otterbein, L. E., B. S. Zuckerbraun, M. Haga, F. Liu, R. Song, A. Usheva, C. Stachulak, N. Bodyak, R. N. Smith, E. Csizmadia, S. Tyagi, Y. Akamatsu, R. J. Flavell, T. R. Billiar, E. Tzeng, F. H. Bach, A. M. Choi and M. P. Soares (2003). "Carbon monoxide suppresses arteriosclerotic lesions associated with chronic graft rejection and with balloon injury." Nat Med 9(2): 183-190.
Picard-Ami, L. A., Jr., A. MacKay and C. L. Kerrigan (1991). "Pathophysiology of ischemic skin flaps: differences in xanthine oxidase levels among rats, pigs, and humans." Plast Reconstr Surg 87(4): 750-755.
Prada, F. S., G. Arrunategui, M. C. Alves, M. C. Ferreira and A. V. Zumiotti (2002). "Effect of allopurinol, superoxide-dismutase, and hyperbaric oxygen on flap survival." Microsurgery 22(8): 352-360.
Pugh, C. M., R. H. Dennis and E. A. Massac (1996). "Evaluation of intraoperative anticoagulants in microvascular free-flap surgery." J Natl Med Assoc 88(10): 655-657.
Restifo, R. J. and J. G. Thomson (1998). "The preconditioned TRAM flap: preliminary clinical experience." Ann Plast Surg 41(4): 343-347.
Rosen, H. M., M. J. Slivjak and F. X. McBrearty (1987). "The role of perfusion washout in limb revascularization procedures." Plast Reconstr Surg 80(4): 595-605.
Rosero, O., K. Németh, Z. Turóczi, A. Fülöp, D. Garbaisz, A. Győrffy, A. Szuák, B. Dorogi, M. Kiss, Á. Nemeskéri, L. Harsányi and A. Szijártó (2014). "Collateral circulation of the rat lower limb and its significance in ischemia-reperfusion studies." Surg Today 44(12): 2345-2353.
Sambuy, M. T., A. C. Costa, C. Cohen and I. Chakkour (2012). "Effect of Ginkgo biloba extract (GbE-761) on the survival of fasciocutaneous flaps in rats." Phytother Res 26(2): 299-302.

Samlaska, C. P. and E. A. Winfield (1994). "Pentoxifylline." J Am Acad Dermatol 30(4): 603-621.
Santistevan, J. R. (2017). "Acute Limb Ischemia: An Emergency Medicine Approach." Emerg Med Clin North Am 35(4): 889-909.
Savaş, S., N. Delibaş, C. Savaş, R. Sütçü and A. Cindaş (2002). "Pentoxifylline reduces biochemical markers of ischemia-reperfusion induced spinal cord injury in rabbits." Spinal Cord 40(5): 224-229.
Scheufler, O., R. Andresen, A. Kirsch, D. Banzer and E. Vaubel (2000). "Clinical results of TRAM flap delay by selective embolization of the deep inferior epigastric arteries." Plast Reconstr Surg 105(4): 1320-1329.
Schubert, W., D. W. Hunter, G. Guzman-Stein, D. H. Ahrenholz, L. D. Solem, T. D. Dressel and B. L. Cunningham (1987). "Use of streptokinase for the salvage of a free flap: case report and review of the use of thrombolytic therapy." Microsurgery 8(3): 117-121.
Segersvärd, H., P. Lakkisto, M. Hänninen, H. Forsten, J. Siren, K. Immonen, R. Kosonen, M. Sarparanta, M. Laine and I. Tikkanen (2018). "Carbon monoxide releasing molecule improves structural and functional cardiac recovery after myocardial injury." Eur J Pharmacol 818: 57-66.
Sener, A., K. C. Tran, J. P. Deng, B. Garcia, Z. Lan, W. Liu, T. Sun, J. Arp, M. Salna, P. Acott, G. Cepinskas, A. M. Jevnikar and P. P. Luke (2013). "Carbon monoxide releasing molecules inhibit cell death resulting from renal transplantation related stress." J Urol 190(2): 772-778.
Sener, G., E. Sener, O. Sehirli, A. V. Oğünç, S. Cetinel, N. Gedik and A. Sakarcan (2005). "Ginkgo biloba extract ameliorates ischemia reperfusion-induced renal injury in rats." Pharmacol Res 52(3): 216-222.
Shah, D. K., W. X. Zhang, D. L. Forman, A. Prabhat, M. L. Urken and H. Weinberg (1996). "Combination therapy for salvaging a failing, experimental skin flap." J Reconstr Microsurg 12(6): 365-369.
Shih, H. B., A. Shakir and D. H. Nguyen (2016). "Use of Indocyanine Green-SPY Angiography for Tracking Lymphatic Recovery After Lymphaticovenous Anastomosis." Ann Plast Surg 76 Suppl 3: S232-237.
Simpson, P. J., R. F. Todd, 3rd, J. C. Fantone, J. K. Mickelson, J. D. Griffin and B. R. Lucchesi (1988). "Reduction of experimental canine myocardial reperfusion injury by a monoclonal antibody (anti-Mo1, anti-CD11b) that inhibits leukocyte adhesion." J Clin Invest 81(2): 624-629.
Sirmali, M., E. Uz, R. Sirmali, A. Kilbaş, H. R. Yilmaz, I. Altuntaş, M. Naziroğlu, N. Delibaş and H. Vural (2007). "Protective effects of erdosteine and vitamins C and E combination on ischemia-reperfusion-induced lung oxidative stress and plasma copper and zinc levels in a rat hind limb model." Biol Trace Elem Res 118(1): 43-52.
Smith, G. W., C. J. McArthur and I. J. Simpson (1983). "Circulating immune complexes in myocardial infarction." J Clin Lab Immunol 12(4): 197-199.
Song, W., J. Zhao, X. S. Yan, X. Fang, D. S. Huo, H. Wang, J. X. Jia and Z. J. Yang (2019). "Mechanisms Associated with Protective Effects of Ginkgo Biloba Leaf Extracton in Rat Cerebral Ischemia Reperfusion Injury." J Toxicol Environ Health A 82(19): 1045-1051.
Souza Júnior, S. S., A. A. Moreira Neto, A. F. Schmidt Júnior, J. B. Lemos and O. R. Rodrigues (2013). "Biochemical study of the effects of cilostazol in rats subjected to acute ischemia and reperfusion of hind limbs." Acta Cir Bras 28(5): 361-366.

Söğüt, Ö. (2017). N-Asetilsistein'nin Akut Karaciğer Yetmezliğinde ve Antibiyoterapiye Destek Amacıyla Kullanımı. ATUDER Kapadokya Toksikoloji Sempozyumu Kapadokya

Sönmez, T. (2018). Sıçan infeior epigastrik arter ada flebi venöz iskemi modelinde Pentoksifilin ve N-Asetilsistein' in tek ve birlikte kullanılarak iskemik hasarın değerlendirilmesi Doktora Tezi İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi

Stanford, S. J., M. J. Walters, A. A. Hislop, S. G. Haworth, T. W. Evans, B. E. Mann, R. Motterlini and J. A. Mitchell (2003). "Heme oxygenase is expressed in human pulmonary artery smooth muscle where carbon monoxide has an anti-proliferative role." Eur J Pharmacol 473(2-3): 135-141.

Stein, A. B., R. Bolli, B. Dawn, S. K. Sanganalmath, Y. Zhu, O. L. Wang, Y. Guo, R. Motterlini and Y. T. Xuan (2012). "Carbon monoxide induces a late preconditioning-mimetic cardioprotective and antiapoptotic milieu in the myocardium." J Mol Cell Cardiol 52(1): 228-236.

Strock, P. E. and G. Majno (1969). "Vascular responses to experimental tourniquet ischemia." Surg Gynecol Obstet 129(2): 309-318.

Suha, T., M. Asli, S. Aynur, K. Yunus, M. Ahmet, D. Selim, Y. Esin, T. Ozgur, N. S. Ari and T. Süleyman (2016). "Effects of N-acetylcysteine and ethyl pyruvate on ischemia-reperfusion injury in experimental electrical burn model." Am J Emerg Med 34(7): 1217-1224.

Suval, W. D., W. N. Durán, M. P. Borić, R. W. Hobson, 3rd, P. B. Berendsen and A. B. Ritter (1987). "Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury." Am J Surg 154(2): 211-218.

Szabo, M. E., M. T. Droy-Lefaix and M. Doly (1995). "EGb 761 and the recovery of ion imbalance in ischemic reperfused diabetic rat retina." Ophthalmic Res 27(2): 102-109.

Takhtfooladi, H. A., S. Hesaraki, F. Razmara, M. A. Takhtfooladi and H. Hajizadeh (2016). "Effects of N-acetylcysteine and pentoxifylline on remote lung injury in a rat model of hind-limb ischemia/reperfusion injury." J Bras Pneumol 42(1): 9-14.

Tayem, Y., T. R. Johnson, B. E. Mann, C. J. Green and R. Motterlini (2006). "Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity by a carbon monoxide-releasing molecule." Am J Physiol Renal Physiol 290(4): F789-794.

Tian, X. X., B. L. Wang, Y. Z. Cao, Y. X. Zhong, Y. Y. Tu, J. B. Xiao, Q. F. He and L. N. Zhai (2015). "Comparison of protective effects of safflor injection and extract of Ginkgo biloba on lung ischemia/reperfusion injury in rabbits." Chin J Integr Med 21(3): 229-233.

Tiryakioglu, O., K. Erkoc, B. Tunerir, O. Uysal, H. F. Altin, T. Gunes and S. Aydin (2015). "The effect of iloprost and N-acetylcysteine on skeletal muscle injury in an acute aortic ischemia-reperfusion model: an experimental study." Biomed Res Int 2015: 453748.

Topp, S., W. T. Knoefel, A. Schutte, S. Brilloff, X. Rogiers and M. Gundlach (2001). "Ginkgo biloba (EGB 761) improves microcirculation after warm ischemia of the rat liver." Transplant Proc 33(1-2): 979-981.

Tsai, T. M., J. B. Jupiter, F. Serratoni, T. Seki and K. Okubo (1982). "The effect of hypothermia and tissue perfusion on extended myocutaneous flap viability." Plast Reconstr Surg 70(4): 444-454.

Turóczi, Z., P. Arányi, Á. Lukáts, D. Garbaisz, G. Lotz, L. Harsányi and A. Szijártó (2014). "Muscle fiber viability, a novel method for the fast detection of ischemic muscle injury in rats." PLoS One 9(1): e84783.

Vadiei, K., L. J. Brunner and D. R. Luke (1989). "Effects of pentoxifylline in experimental acute renal failure." Kidney Int 36(3): 466-470.
Venturi, M. L., A. N. Mesbahi, L. R. Copeland-Halperin, V. Y. Suh and L. Yemc (2017). "SPY Elite's Ability to Predict Nipple Necrosis in Nipple-Sparing Mastectomy and Immediate Tissue Expander Reconstruction." Plast Reconstr Surg Glob Open 5(5): e1334.
Vera, T., J. R. Henegar, H. A. Drummond, J. M. Rimoldi and D. E. Stec (2005). "Protective effect of carbon monoxide-releasing compounds in ischemia-induced acute renal failure." J Am Soc Nephrol 16(4): 950-958.
Vetto, R. M. and B. Brant (1968). "Control of declamping shock." Am J Surg 116(2): 273-279.
Vretos, K. A. and A. G. Tsavissis (1995). "Antithrombotic and antinflammatory drugs for protection of microvascular anastomosis." Acta Orthop Scand Suppl 264: 48-49.
Wagh, M., G. Pantazi, R. Romeo, J. V. Hurley, W. A. Morrison and K. R. Knight (2000). "Cold storage of rat skeletal muscle free flaps and pre-ischemic perfusion with modified UW solution." Microsurgery 20(7): 343-349.
Waikakul, S., A. Unnanantana and V. Vanadurongwan (1999). "The role of allopurinol in digital replantation." J Hand Surg Br 24(3): 325-327.
Wang, J., D. Zhang, X. Fu, L. Yu, Z. Lu, Y. Gao, X. Liu, J. Man, S. Li, N. Li, X. Chen, M. Hong, Q. Yang and J. Wang (2018). "Carbon monoxide-releasing molecule-3 protects against ischemic stroke by suppressing neuroinflammation and alleviating blood-brain barrier disruption." J Neuroinflammation 15(1): 188.
Watson, J. D., S. M. Gifford and W. D. Clouse (2014). "Biochemical markers of acute limb ischemia, rhabdomyolysis, and impact on limb salvage." Semin Vasc Surg 27(3-4): 176-181.
Wechselberger, G., T. Schoeller, K. Ohler, H. Anderl and M. Ninković (1998). "Flap salvage in a "flow-through" flap by manual thrombectomy plus thrombolytic therapy." J Reconstr Microsurg 14(2): 127-129.
Wei, F. C. and S. Mardini (2016). Flaps and Reconstructive Surgery E-Book, Elsevier Health Sciences.
Wilkins, E. G., R. S. Rees, D. Smith, B. Cashmer, J. Punch, G. O. Till and D. J. Smith, Jr. (1993). "Identification of xanthine oxidase activity following reperfusion in human tissue." Ann Plast Surg 31(1): 60-65.
Xiao, G., M. Lyu, Y. Wang, S. He, X. Liu, J. Ni, L. Li, G. Fan, J. Han, X. Gao, X. Wang and Y. Zhu (2019). "Ginkgo Flavonol Glycosides or Ginkgolides Tend to Differentially Protect Myocardial or Cerebral Ischemia-Reperfusion Injury via Regulation of TWEAK-Fn14 Signaling in Heart and Brain." Front Pharmacol 10: 735.
Yabluchanskiy, A., P. Sawle, S. Homer-Vanniasinkam, C. J. Green, R. Foresti and R. Motterlini (2012). "CORM-3, a carbon monoxide-releasing molecule, alters the inflammatory response and reduces brain damage in a rat model of hemorrhagic stroke." Crit Care Med 40(2): 544-552.
Yamano, Y. (1993). "Replantation of fingertips." J Hand Surg Br 18(2): 157-162.
Yang, A. E., C. A. Hartranft, A. Reiss and C. R. Holden (2018). "Improving Outcomes for Lower Extremity Amputations Using Intraoperative Fluorescent Angiography to Predict Flap Viability." Vasc Endovascular Surg 52(1): 16-21.
Yang, Y., P. Liu, L. Chen, Z. Liu, H. Zhang, J. Wang, X. Sun, W. Zhong, N. Wang, K. Tian and J. Zhao (2013). "Therapeutic effect of Ginkgo biloba polysaccharide in rats with focal cerebral ischemia/reperfusion (I/R) injury." Carbohydr Polym 98(2): 1383-1388.

Yao, X., N. Chen, C. H. Ma, J. Tao, J. A. Bao, C. Zong-Qi, Z. T. Chen and L. Y. Miao (2015). "Ginkgo biloba extracts attenuate lipopolysaccharide-induced inflammatory responses in acute lung injury by inhibiting the COX-2 and NF-κB pathways." Chin J Nat Med 13(1): 52-58.
Yenilmez, A., F. S. Kilic, B. Sirmagul, B. Isikli, E. Aral and S. Oner (2007). "Preventive effects of Ginkgo biloba extract on ischemia-reperfusion injury in rat bladder." Urol Int 78(2): 167-172.
Yildirim, N., D. Simsek, S. Kose, A. G. S. Yildirim, C. Guven, G. Yigitturk and O. Erbas (2018). "The protective effect of Gingko biloba in a rat model of ovarian ischemia/reperfusion injury: Improvement in histological and biochemical parameters." Adv Clin Exp Med 27(5): 591-597.
Yoon, Y. E., K. S. Lee, Y. J. Lee, H. H. Lee and W. K. Han (2017). "Renoprotective Effects of Carbon Monoxide-Releasing Molecule 3 in Ischemia-Reperfusion Injury and Cisplatin-Induced Toxicity." Transplant Proc 49(5): 1175-1182.
Zahir, K. S., S. A. Syed, J. R. Zink, R. J. Restifo and J. G. Thomson (1998). "Comparison of the effects of ischemic preconditioning and surgical delay on pedicled musculocutaneous flap survival in a rat model." Ann Plast Surg 40(4): 422-428; discussion 428-429.
Zhang, C., J. Zu, H. Shi, J. Liu and C. Qin (2004). "The effect of Ginkgo biloba extract (EGb 761) on hepatic sinusoidal endothelial cells and hepatic microcirculation in CCl4 rats." Am J Chin Med 32(1): 21-31.
Zhang, L. M., D. X. Zhang, L. Fu, Y. Li, X. P. Wang, M. M. Qi, C. C. Li, P. P. Song, X. D. Wang and X. J. Kong (2019). "Carbon monoxide-releasing molecule-3 protects against cortical pyroptosis induced by hemorrhagic shock and resuscitation via mitochondrial regulation." Free Radic Biol Med 141: 299-309.
Zhang, M., W. G. Austen, Jr., I. Chiu, E. M. Alicot, R. Hung, M. Ma, N. Verna, M. Xu, H. B. Hechtman, F. D. Moore, Jr. and M. C. Carroll (2004). "Identification of a specific self-reactive IgM antibody that initiates intestinal ischemia/reperfusion injury." Proc Natl Acad Sci U S A 101(11): 3886-3891.
Zimmermann, A., C. Roenneberg, H. Wendorff, T. Holzbach, R. E. Giunta and H. H. Eckstein (2010). "Early postoperative detection of tissue necrosis in amputation stumps with indocyanine green fluorescence angiography." Vasc Endovascular Surg 44(4): 269-273.

EKLER

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başkanlığı

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900162945 29.05.2019
Konu : HADYEK Kararı.

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 22.05.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900153765 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 24.05.2019 tarih ve 6 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 100 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Mustafa Sinan AKTAŞ
Başkan Vekili

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr
Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=9CE84B186F0

TOPLANTI TARİHİ : 24.05.2019

TOPLANTI SAYISI : 6

KARAR N0 100: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Ensar Zafer BARIN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülecek olan **"Sıçan Akut İskemi Reperfüzyon Modelinde CORM-3 Molekülünün Diğer İlaçlarla Karşılaştırılması"** isimli tez çalışması ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 22.05.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900153765 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen tez çalışmasının yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesinin, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi

Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

T.C.
ATATÜRK ÜNİVERSİTESİ REKTÖRLÜĞÜ
Rektörlük

Sayı : 75296309-050.01.04-E.1900280718 02.10.2019
Konu : HADYEK Kararı.

TIP FAKÜLTESİ DEKANLIĞINA

İlgi : 26.09.2019 tarihli ve 42190979-000-E.1900274944 sayılı belge.

İlgide kayıtlı yazınız; Atatürk Üniversitesi Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulumuzun 26.09.2019 tarih ve 11 sayılı Oturumunda Hayvan Deneyleri Yerel Etik Kurulu Başvuru Formu ve ekli belgeleri, gerekçe, amaç, yaklaşım ve yöntemler dikkate alınarak incelenmiş ve aşağıya çıkarılan 157 no'lu kararı ile sözkonusu tez çalışmasının içeriğinde herhangi bir değişiklik yapılmaksızın isim değişikliğinin yapılarak yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, mevcut oy birliği ile karar verilmiş olup, çalışmanın Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülmesine ve taahhütname hükümlerine göre çalışmada kullanılan hayvanlara ait bilgilerin, T.C. Tarım ve Orman Bakanlığı, Doğa Koruma ve Milli Parklar Genel Müdürlüğünün, Hayvanları Koruma Bilgi Sistemi (HAYBİS)'ne girilebilmesi için ekte sunulan "HADYEK Sonuç Raporu"nun Başkanlığımıza gönderilmesi hususunda;

Gereğini bilgilerinize arz ederim.

Prof.Dr. Fikret ÇELEBİ
Kurul Başkanı

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: http://www.atauni.edu.tr/#?birim=veteriner-fakultesi
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr
Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr

Bu belge, 5070 sayılı Elektronik İmza Kanununun 5. maddesi gereğince güvenli elektronik imza ile imzalanmıştır.
https://ubys.atauni.edu.tr/ERMS/Record/Confirmation/Confirmation?code=0579B2D4F59

TOPLANTI TARİHİ : 26.09.2019

TOPLANTI SAYISI : 11

KARAR N0 157: Atatürk Üniversitesi Tıp Fakültesi Dekanlığı, Cerrahi Tıp Bilimleri Bölümü, Plastik, Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahisi Anabilim Dalı öğretim üyesi Dr.Öğr.Üyesi Ensar Zafer BARIN'ın yürütücülüğünde, Atatürk Üniversitesi Tıbbi Deneysel Uygulama ve Araştırma Merkezi (ATADEM) Laboratuarlarında yürütülen **"Sıçan Akut İskemi Reperfüzyon Modelinde CORM-3 Molekülünün Diğer İlaçlarla Karşılaştırılması"** isimli tez çalışmasının içeriğinde herhangi bir değişiklik yapılmadan çalışmanın isminin Atatürk Üniversitesi Bilimsel Araştırma Proje (BAP) Ofisi tarafından **"Sıçan Alt Ekstremite Akut İskemi Reperfüzyon Modelinde CORM-3 Molekülünün Etkilerinin Gingko biloba, N-Asetilsistein ve Pentoksifilin İle Karşılaştırılması"** olarak düzeltme isteği ile ilgili Tıp Fakültesi Dekanlığının 26.09.2019 tarih ve 42190979-000-E.1900274944 sayılı yazısı ile ekleri görüşüldü.

Yapılan görüşmelerden sonra; adı geçen tez çalışmasının içeriğinde herhangi bir değişiklik yapılmaksızın isim değişikliğinin yapılarak yürütülmesinin etik kurallarına uygun olduğuna, çalışma sonucunun Başkanlığımıza bildirilmesinin, mevcut oy birliği ile kabulüne; karar verildi.

Ek : Sonuç Raporu. 1 Adet.

Atatürk Üniversitesi Veteriner Fakültesi 25240 Erzurum
Tel: +90 442 2317222
Elektronik Ağ: http://www.atauni.edu.tr/#/birim=veteriner-fakultesi
Kep Adresi: atauni@hs01.kep.tr

Bilgi: Mehmet KOCA
Faks: +90 442 2317244
E-Posta: vetfak@atauni.edu.tr