

T.C.
SELÇUK ÜNİVERSİTESİ MERAM TIP FAKÜLTESİ
CERRAHİ TIP BİLİMLERİ BÖLÜMÜ
ORTOPEDİ VE TRAVMATOLOJİ ANA BİLİM DALI

132129

**VERAPAMİLİN İSKELET KASI İSKEMİ-REPERFÜZYON
HASARI ÖNLENMESİNDEKİ ETKİNLİĞİ VE BU
ETKİNLİĞİN , İLACIN VERİLİŞ ZAMANI (İSKEMİ ÖNCESİ
VE REPERFÜZYON ÖNCESİ) İLE İLİŞKİSİNİN
İNCELENMESİ.**

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DENEYİM MERKEZİ

UZMANLIK TEZİ

HAZIRLAYAN
DR.BÜLENT KILIÇ

DANIŞMAN
DOÇ.DR.TUNÇ CEVAT ÖĞÜN

KONYA/2003

İÇİNDEKİLER

GİRİŞ VE AMAÇ	1
GENEL BİLGİLER	3
MATERYAL VE METOD	14
BULGULAR	19
GRAFİKLER	24
TARTIŞMA	26
KAYNAKÇA	31

TEŞEKKÜR

Bu çalışmada yardımlarını esirgemeyen S.Ü Meram Tıp Fakültesi Patoloji A.B.D'dan Doç.Dr M.Cihat Avunduk'a, S. Ü.Veterinerlik Fakültesi'nden Prof. Dr. İlhami Çelik'e, S.Ü Meram Tıp Fakültesi Biyokimya A.B.D'dan Dr.Öznur Köylü'ye, teknisyen Halil Tencere'ye ve Kenan Çelikkol'a teşekkür ederim .

Asistanlık hayatı boyunca desteklerini esirgemeyen tüm hocalarıma teşekkür ediyorum.

Tez çalışmasını beraber yaptığımız, asistanlığımın ilk günlerinden itibaren benimle en ağır koşullarda bile sorumluluklarını paylaşan, kendimde oluşan mesleki güvenin mimarı ve güvencesini ömrüm boyunca üzerimde hissedeceğim sevgili Doç.Dr.Tunç Cevat Öğün'e ayrıca teşekkür ediyorum

Son olarak sevgili eşim İlker Kılıç'a ve yaşadığım çok zor günlerde yanımda olan tüm insanlara teşekkür ediyorum.

GİRİŞ VE AMAÇ

İskemi–reperfüzyon hasarı (İRH) ortopedi ve travma cerrahisinde sık karşılaşılan, önemli bir problemdir. Damar-sinir yaralanmalarında, kompartman sendromunda, vasküler cerrahi kullanılan rekonstrüktif girişimlerde, yüksek enerjili ezilme tarzı yaralanmalarda önemli ve iyileşmeyi etkileyen bir faktördür¹. Hayatın ve canlılığın sürekliliği için gerekli olan oksijenin reperfüzyon hasarı oluşumunda en önemli etken olması doğadaki sonsuz ironinin bir örneğidir.

Yaşlanma ve iskemik kalp hastalıklarının önlenmesi son yıllarda tıpta üzerinde oldukça sık çalışılan bir konudur. Serbest oksijen radikallerinin yaşlanma, iskemik kalp hastalıkları ve tümör oluşumundaki rollerinin anlaşılmasıyla bu alanda yapılan çalışmalar daha da artmıştır.² İRH’nda temel hasar serbest oksijen radikalleri aracılığı ile olmaktadır¹.

İRH oluşumunda en önemli olay ATP, CPK gibi enerji kaynaklarının bitiminden sonra hücre içi laktat ve Ca^{+2} konsantrasyonunda artıştır¹⁰. Hücre içi artmış Ca^{+2} , Ksantin Dehidrogenaz’ın Ksantin Oksidaz’a dönüşümünü katalizleyip serbest oksijen radikalleri yapımını arttırır.³ Teorik olarak olaya bakıldığı zaman hücre içi Ca^{+2} artışının engellenmesi İRH oluşumunu azaltmalıdır. Reperfüzyon hasarına uğrayacak her hücre aynı zamanda iskemik bir hücredir. İskemik hücrelerin Ca^{+2} kanal blokerlerine cevabı pek çok ilaca olduğu gibi normal hücrelerden farklı olabilir.

Biz bu çalışmada reperfüzyon hasarının önlenmesindeki etkinliği pek çok organda (karaciğer, kalp, bağırsak vb.) çalışılmış ve gösterilmiş olan ancak iskelet kası İRH’nı önlemedeki etkinliğine yönelik son derece sınırlı sayıda çalışma bulunan verapamili kullandık. Verapamilin iskelet

kası İRH'nı önlenmesindeki etkinliğini ve bunun ilacın iskemi öncesi ve reperfüzyon öncesi verilmesi ile değişebilirliğini araştırdık.



GENEL BİLGİLER

Sebepten ne olursa olsun, kan dolaşımı kesilen herhangi bir dokuda belirli bir iskemi süresinden sonra, iskemiye yol açan etkenin ortadan kaldırılması ve yeterli kan akımı sağlanması (reperfüzyon), kapiller dolaşımı iskemi öncesi döneme getiremez. Buna “no-reflow” fenomeni denmektedir.⁴ İskemik dokuya tekrar kan akımı sağlanmasıyla serbest radikallerin olduğu ve bu serbest radikallerin rol aldığı bir takım kimyasal reaksiyonlar sonucunda dokuda nekroz ve ilerleyici hasar meydana geldiği anlaşılmıştır. İşte bu kimyasal olaylar bütününe ve sonuçtaki hasara iskemi reperfüzyon hasarı (İRH) denmiştir.¹

Bir çalışmada reperfüzyon olmadan 4 saatlik intestinal iskemi sonrasında oluşan hasarın 1 saatlik reperfüzyon uygulamasına oranla daha az olduğu gösterilmiştir.⁵ Reperfüzyon hasarının iskemik hasardan daha farklı ve bazen de daha ciddi ve zarar verici olduğu pek çok çalışmayla gösterilmiştir.^{6,7}

İskelet kası iskemiye ve reperfüzyon hasarına en hassas dokulardan biridir⁹. İRH özellikle replantasyon cerrahisinde, kırıklarla beraber görülen yüksek enerjili ezilme tarzı yaralanmalarda, kompartman sendromlarında, damar yaralanmasıyla beraber görülen açık kırıkların tedavisinde ve neticesinde çok önemli rol oynar¹. Son yıllarda özellikle serbest radikallerin ve antioksidanların öneminin kavranmasıyla ve bu konu ile ilgili bilgilerin artmasıyla reperfüzyon hasarını önlemeye yönelik çalışmaların sayısı artmıştır. Ancak kalp, karaciğer, beyin gibi dokularda yapılan çalışmalarla kıyaslandığı zaman iskelet kasında yapılan çalışmaların sayısı nispeten azdır.

İRH da üç önemli olay vardır. Öncelikle enerji üretimi bozulur, daha sonra lökositler aracılığı ile serbest oksijen radikalleri oluşur ve en sonunda hücre perfüzyonu bozulur.⁸

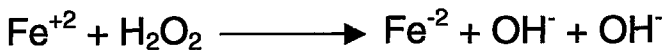
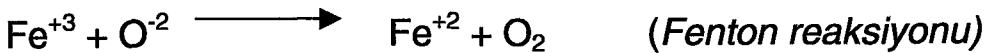
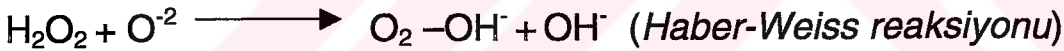
Serbest oksijen radikalleri (SOR) bir veya daha fazla eşleşmemiş elektronu olan ve moleküler oksijenin indirgenmesi veya yükseltgenmesiyle oluşan stabil olmayan bileşiklerdir.⁹ Süperoksit anyonu (O_2^-) moleküler oksijenin bir elektron, hidrojen peroksit (H_2O_2) iki ve hidroksil radikali (OH^-) üç elektron alarak indirgenmesiyle oluşur.^{10,11} Süperoksit anyonu (O_2^-), hidroksil radikali (OH^-) ve hidrojen peroksit (H_2O_2) hücreler için toksiktir.⁹ Serbest radikaller hücre duvarı lipid peroksidasyonu, enzim denatürasyonu, DNA hasarı ve halka kırıkları, tiol bileşiklerinin hasarı, monosit ve makrofajlarda proinflamatuvar sitokin yapımı stimülasyonu, sarkolemma ve sarkoplazmik retikulum disfonksiyonu, damar endoteli hasarı ve damar duvarına nötrofil ve trombosit yapışmasına yol açarak doku hasarı oluştururlar.^{12,3,13,14,15,2}

Normal hücresel solunumda da serbest oksijen radikali oluşumu söz konusudur.⁹ Ancak, bunlar hücre içi enzimatik sistemlerle nötralize edilirler.⁹ Bu koruyucu hücre içi enzimler süperoksit dismutaz (SOD), katalaz (CAT) ve glutatyon peroksidaz (GPx)'dir.^{16,17} SOD, $O_2^- \rightarrow H_2O_2 + O_2$, katalaz $H_2O_2 \rightarrow H_2O + O_2$ dönüşümünü sağlar.¹⁷ GPx ise katalaz'ın görevini hücre dışı ortamda yapan bir enzimdir.¹⁷ Ayrıca seruloplazmin, betakaroten, tioller, sülfür içeren aminoasitler, transferrin, albümin, urat gibi bileşikler de antioksidan olarak kabul edilirler.^{18,19}

İRH'nda oluşan serbest radikaller normal solunuma göre çok daha fazla miktarda olduğu için SOD ve CAT enzimleri kısa sürede tükenir ve hücresel hasar oluşumu engellenemez.^{20,21}

Serbest oksijen radikallerinin en önemli dört kaynağı vardır. Bunlar nötrofil NADPH oksidaz–myeloperoksidaz sistemi, ksantin dehidrogenaz (XD)-ksantin oksidaz (XO) sistemi, katekolamin oksidasyonu ve prostaglandin sentezidir.²²

Uzun süreli iskemide, ATP hipoksantin'e dönüşür.²³ Hipoksantin normal de XD tarafından NAD ve H₂O₂ varlığında ürik asite dönüştürülür.²³ İskemik ortamda ise hücre içi Ca⁺² artışı proteazları aktive ederek XD'yi, XO'ya dönüştürür.²³ XO ise hipoksantin'i ürik asite çevirirken oksijen molekülünü kullanır ve ortaya O⁻² çıkar.²³ Süperoksit anyon (O⁻²) reperfüzyonun 5. dakikasında oluşmaktadır ve oluşan O⁻² spontan olarak H₂O₂ ile reaksiyona girerek, O⁻² den daha reaktif olan hidroksil (OH⁻) iyonunu oluşturur.^{24,25} Normalde OH⁻ oluşumuna yol açan *Haber-Weiss* ve *Fenton reaksiyonları* çok yavaş ilerler. Hipoksik koşullarda ise bu reaksiyon Fe⁺³ kullanarak çok hızlı bir şekilde ilerler ve *Fenton reaksiyonu* adını alır.



Bu reaksiyonlar sonucu ortaya çıkan OH⁻ radikalleri hücre zarındaki yağ asitleri ile reaksiyona girip lipid peroksidasyonuna yol açar ve fosfolipaz-A₂ yi artırır.¹ Fosfolipaz-A₂ hidrolitik bir enzimdir ve hücreyi ölüme götürür.¹ İskemi ve sonrasında aktivitesi artan XO enzim sistemi pek çok dokuda SOR'nin kaynağı olarak gösterilmiştir.^{26,27,28,23,29,30,25} Çalışmamızın ve genel anlamda Ca⁺² kanal blokerlerinin İRH kullanım amacı XD'ın XO'a dönüşümünü tetikleyen hücre içi Ca⁺² artışını bloke etmektir.

ATP azalmasıyla hücre içinde artan Ca^{+2} 'un bir diğer etkisi fosfolipaz A2 aktivasyonunu sağlaması sonucunda ortaya çıkan lökotrienlerin nötrofiller için aktifleyici rol oynayarak reperfüzyon hasarına katkıda bulunmasıdır.³¹

Hangi organ olursa olsun iskemik bir organa tekrar kan akımı sağlandığı zaman iskemi döneminde biriken toksik metabolitlerin sistemik dolaşıma geçmesi ve major intrasellüler katyon olan potasyumun hücre dışına sızması ile ani ölümler meydana gelebilir.³²

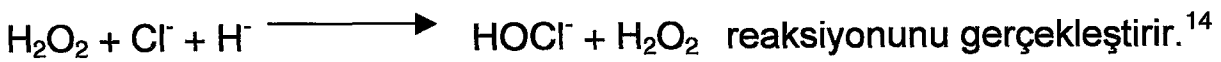
Normalde nötrofiller tarafından tüketilen oksijenin %70'i NADPH Oksidaz tarafından O^{-2} 'e, O^{-2} ise daha önce belirttiğimiz şekilde H_2O_2 kullanılarak OH^{-} 'e dönüştürülür.²⁵ OH^{-} en zararlı serbest radikaldir.²⁵ Lipid peroksidasyonunu başlatarak sülfidril gruplarının oksidasyonunu, sitokrom enzimlerinin inaktivasyonunu ve membran taşıyıcı proteinlerinin fonksiyonlarını bozarak etkili olmaktadır.²⁵

SOR'nin sekonder etkileri Ca^{+2} üzerindendir.³³ Bir çok hücre faaliyeti (eksitasyon–kontraksiyon), bir çok enzim ve hücre metabolizma regülasyonu sitozolik serbest Ca^{+2} konsantrasyonundaki değişikliklerle sağlanır.³³ Bu nedenle hücre Ca^{+2} 'unun büyük kısmı ya bağlı ya da subsellüler kompartmanlarda sekestredir.³³ Plazma membranı, sitozolik proteinler ve intrasellüler fosfatlar Ca^{+2} u önemli miktarda bağlar. Ayrıca endoplazmik retikulum ve mitokondriler Ca^{+2} u membranlarına bağlar³³ ve hatta Ca^{+2} u sitozolden kendi içlerine transfer ederler.³⁴ Endoplazmik retikulum sitozoldaki serbest Ca^{+2} u normal düzeyde tutmakla görevli en önemli organelidir.³⁴ Serbest sitozolik Ca^{+2} artışı "Ca ATP' az" aktivitesini artırır.³⁴ Bu da ATP kullanımını artırarak, iskemik koşullarda zaten yetersiz olan ATP miktarını daha da azaltır.³⁴

Nötrofiller iskemi sonrası doku hasarını hem SOR, hem de sitotoksik enzim salgılayarak oluştururlar.^{35,36} Nötrofil sayı veya aktivitesinin azaltılması ile İRH'nın azaltıldığı pek çok çalışmada gösterilmiştir.^{37,38,39,40,41,42} İnflamatuar hücre kaynaklı serbest oksijen radikalleri reperfüzyon hasarında en önemli araçtır.³⁹ Lökositler proteaz, kollagenaz, elastaz gibi enzimlerle endotel hücre glikokaliksini ve bazal membranı harab ederek kapiller geçirgenliği arttırırlar.³⁹ Ayrıca iskemi ve reperfüzyon inflammatuar cevap oluşturup kompleman sistemini aktive ederek LTB₄, PAF, C5a artışına yol açıp dokuya nötrofil infiltrasyonunu arttırır.⁴³ İskemi sonrasında lökositlerden TNF α , IL-1 β gibi sitokinlerin yapımı artarak hem hücre geçirgenliği arttırılır hem de lökositler için adhezyon moleküllerinin yapımı artar.⁴¹

Lipid peroksidasyonuna en duyarlı bileşikler membran fosfolipidlerinin yapısında bulunan doymamış uzun zincirli yağ asitleridir.⁹ Bu yüzden lipid peroksidasyonun en önemli hasarı hücre zarında olmaktadır.⁹ İskemi ile beraber hücre zarı bütünlük ve geçirgenliğinde bozukluk meydana gelmektedir.⁹

Myeloperoksidaz enzim sistemi ise sadece nötrofillerde bulunur ve



Hipoklorik asit(HOCl⁻), H₂O₂ den yaklaşık 100 kat daha toksik bir radikaldir.⁴⁴ HOCl⁻ hücre membranındaki tiol gruplarını okside edip membran transport sistemini inhibe ederek hücre ölümüne neden olur.⁴⁴ İRH'nda Hipoksantin oksidaz sisteminden kaynaklanan serbest oksijen radikalleri moleküler tetikleyici, hücre içi Ca⁺² artışı ile aktive olan fosfolipaz A₂ ise enzimatik tetikleyicidir.³ Her iki sistem de PMN lökosit göçüne sebep olarak hasar oluştururlar.⁴⁵

Endotel hücreleri de serbest radikallerdeki artışa hücre dışında nötrofiller için spesifik reseptörleri arttırarak ve sitokin salgılayarak cevap verir.⁴⁰ Aktive olan nötrofiller myeloperoksidaz, proteinaz, lipaz, glikozidaz gibi enzimler salgılayarak yıkıma sebep olurlar.^{46,47} Lökositlerin endotel hücrelerine adhezyonu endoteldeki P ve E selektin ve lökosit yüzeyindeki CD11/CD18 ve L selektin molekülleri ile gerçekleşir.⁴⁰

Forbes ve arkadaşları iskelet kasında iskemi sonrası reperfüzyonda perfüze olan kapiler sayısında azalma ve postkapiller venüllerde lökosit sayısında artma tespit etmişlerdir.⁴⁸ Özellikle 15µ'dan küçük mikro damarlarda akım bozukluğu daha belirgindir.^{49,50}

Reperfüzyonda venül lümeninin lökositler tarafından tıkanması, ödem ve kapiller direnç artışına yol açıp, reperfüzyon yaralanmasına katkıda bulunur.

Uzun süreli iskemiden sonra reperfüzyon tekrar sağlansa bile mikrovasküler sistemde akımın olmaması yani "no-reflow" fenomeninden endotel hasarı, düz kas spazmı ve tromboz sorumlu tutulmuştur.^{51,52}

İskelet kası için "no-reflow" fenomeni 3-4 saatlik iskemiden sonra daha ilerleyici ve önlenemez boyutlara ulaşır.⁵³

İRH azaltılması için pek çok ilaç, immunolojik ajan ve cerrahi manipulasyon yapılmıştır.

İRH azaltılması için kullanılan ilaçlar bugün için antioksidan olarak bilinen SOR oluşumu ve etkisini azaltan ilaçlardır.

İRH azaltılması için ilk ve en sık araştırması yapılan ajanlardan birisi Allopurinol'dur. Allopurinol, iskemi sırasında ortaya çıkan ATP yıkım

ürünlerinden olan hipoksantin ksantine dönüşümünü katalizleyen XO oksidaz enzimini bloke ederek etki gösterir.

Katalaz İRH' nı engellemede kullanılan başka bir ajandır. Etki mekanizması H_2O_2 nin H_2O ya dönüşümünü sağlamaktır.

NO bir başka ajandır. Normal de NO pek çok hücrel faaliyetlerde regülatör görevi oynayan hücre içi bir habercidir. NO, nitrik oksit sentaz (NOS) tarafından sentezlenir. NOS'ın 3 formu vardır ve bu 3 farklı formdaki enzim sayesinde hem hücre koruyucu özellik göstermekte hem de inflamatuvar hastalık ve İRH' ında zararlı etkiler oluşturmaktadır.⁵⁵ NO nun antioksidan olarak davrandığını gösteren çalışmalar da yapılmıştır. İRH da NO yapımı fizyolojik koşullardan farklıdır. NO nun pek çok organın İRH ında hem yararlı hem de zararlı etkileri olduğu gösterilmiştir. Çeşitli NOS enzim inhibitörlerinin kullanımı ile kardiyak infarkt alanının azaldığı.^{56,57} Flep ömrünün uzadığı,⁵⁸ iskelet kasında İRH'nın önlenildiği tespit edilmiştir.^{59,60} Öte taraftan NO yapımını arttıran L-arginin uygulaması ile mezenterik damarlarda endotel lökosit adezyonunun önlenildiği gösterilmiştir.^{61,62} Bu antiadezif etki O_2^- anyonunu inaktive edip vazodilatasyon yapıp PAF yapımını inhibe ederek gösterir.⁶³ NO ayrıca mastosit ve trombositler de proinflamatuvar mediatörlerin yapımını azaltıp antiadezif etki gösterir.^{64,65} NO nun donör ve inhibitörlerinin aynı anda kullanıldığı deneylerde; NO donörünü reperfüzyon öncesi verdiği zaman; inhibitörünün ise iskemi öncesi uygulamalarında faydalı olduğu gösterilmiştir.^{66,67}

E vitamini (α tokoferol asetat) bir başka sık kullanılmış bir ajandır. α tokoferol doymuş lipidleri stabilize edip onların oksidasyonunu engeller. α tokoferol serbest radikallerle reaksiyona girerek onları etkisini azaltır. Yapılan çalışmalarda α tokoferol iskelet kasında İRH'nı azalttığı gösterilmiştir.^{68,69} α tokoferol lipid peroksidasyonunun zincir reaksiyonlarını inhibe ederken suda çözünmeyen askorbik asit okside

olmuş α tokoferolun tekrar oluşturulmasında görev yapar ve bu yüz den İRH'ını azaltmak için kullanılabileceği belirtilmiştir.

İloprost ile ilgili yapılmış çalışmalarda mevcuttur. İloprost prostosiklin anoloğudur. Doğancı ve arkadaşları İloprostun iskelet kasında reperfüzyon hasarını azalttığını göstermiştir.⁷⁰

İRH azaltmak için kullanılan ajanların bir bölümü nötrofil göçü ve/veya adezyonunu önlemeye yönelik ajanlardır. Dolaşımdan lökosit arındırılması, nötrofil yüzey reseptörlerine karşı antikor kullanımı, siklofosfamid ile lökosit sayısının azaltılması bunlardan bazılarıdır.^{71,72,33} Ancak deneysel koşullarda harikalar yaratan ilaçların bugün için klinik kullanımları mümkün değildir.

Lökositlerin endotel hücrelerine adezyonu lökosit yüzeyindeki CD11/18 ve endotel hücre yüzeyindeki L selektin ile olmaktadır. C_{5a} LTb₄, PAF IL-8, TNF α ,IL-1, superoksit anyonu ve H₂O₂ gibi maddeler endotel hücre yüzeyindeki CD11/18 yapımını arttıırırlar. CD11/18 moleküne karşı üretilen antikorlarla barsakve mezenter, iskelet kası akciğerve kalp ve beyin⁷³ de İRH azaltılabilmiiştir.

Mannitol da İRH'nı azaltması için denenmiş ve ayrıca klinikte kullanılan bir preparattır.¹⁰ Mannitol hidroksil grubu taşıyan radikallerin tüketicisidir ve antioksidan etkiyi bu yolla gösterir.¹⁰

İRH'nı azaltmak için çeşitli cerrahi manipölasyonlar denenmiştir. Bunlardan ilki 1986 da Murry tarafından ortaya atılan "ischemic preconditioning"dir. Burada köpek miyokardı üzerinde 5 dakikalık iskemiye 5 dakikalık reperfüzyon dönemi takip ettirilip, bunun 4 siklus boyunca yapılmasıyla İRH azaltılmiiştir. Diğer bir cerrahi metod ise kademeli reperfüzyondur. İskemiden sonra reperfüzyonun tekrar sağlanması başlangıçta hiperemik bir kan akımı meydana getirir. Hiperemik oksijenize doku SOR için dominant bir kaynaktır. Kademeli

reperfüzyonda bu reaktif hiperemik akım önlenmekte ve SOR oluşumu azaltılmaktadır. Böylece İRH azaltılabilir. ^{74,75,76,77,78,79,80,81,82}

SOD, GPX, ve Katalaz serbest oksijen radikallerine karşı en önemli savunma mekanizmalarıdır. Bunlardan SOD ve katalaz hücre içinde etki gösterirken GPX hücre dışında etki göstermektedir. GPX selenyum bağımlı bir enzimdir. Öte yandan SOD Zn-Cu ve Mn bağımlı iki formu vardır. Bu enzimlerin aktivitelerindeki rollerinden dolayı Zn ve selenyum son yıllarda serbest oksijen radikali kaynaklı pek çok tablonun önlenmesinde deneysel olarak kullanılmıştır.

İskemi ve reperfüzyon son tahlilde akut inflamatuvar bir süreç oluşturur. Kemotaktik peptidler, lipid mediatörleri ve kompleman sistemi aktive olarak nötrofil kemotaksisi uyarılır. LTb₄, PAF ve C_{5a} gibi kemotaktif maddelerin sentezinin azaltılması –örn: steroid- İRH oluşumunu deneysel olarak azaltabilmiştir.

Son yıllarca popülerliği gittikçe artan ve özellikle miyokartta İRH'nı ciddi şekilde azaltan ajanlar ACE inhibitörleridir. Sülfidril grubu içermeyen ACE inhibitörleri –örn: enalapril- iskemi-reperfüzyon sonrası oluşan serbest radikallere karşı koruyucu etki göstermektedir. ⁸³ Ancak bu etki ilginç olarak siklooksijenaz enzim inhibitörü olan indometazin tarafından ortadan kaldırılmıştır. Buda ilaç etkisinin prostaglandin sentez veya salınımı yoluyla olabileceğini düşündürmüştür. ⁸⁴

VERAPAMİL

Bugün için 4 tip voltaj bağımlı Ca⁺² kanalı bilinmektedir. ⁵⁴ Ayrıca reseptörlerle işleyen Ca⁺² kanalları da mevcuttur. ⁵⁴ Voltaj bağımlı Ca⁺² kanalları L,T,N, ve P olmak üzere dört tiptir. ⁵⁴ L tipi düz kasta daha fazla bulunmaktadır. ⁵⁴ Ca⁺² kanal blokerlerinin etkisi lokal anestetiklerin etkisine benzer. ⁵⁴ Bu ilaçlar depolarize membranın iç kısmına etki eder ve Ca⁺² kanallarına güçlü olarak bağlanır. ⁵⁴ Düz kasta reseptörle çalışan

Ca^{+2} kanalları ile, aynı voltaj kapılı kanallarda olduğu gibi hücre içine Ca^{+2} girişi azaltılır.⁵⁴ İskelet kasındaki kasılma Ca^{+2} kanal blokerlerinden etkilenmez çünkü, eksitasyon–kontraksiyon olayında hücre içi Ca^{+2} havuzundan yararlanır.⁵⁴

Verapamil, diltiazem, nifedipin, bepridil yapı olarak birbirine benzeyen Ca^{+2} kanal blokeri ajanlardır. Bu ajanlardan bepridil, kardiyak depresyon yapmadan en yüksek düzeyde Ca^{+2} kanal blokajı yapan ajandır. Ancak, bu ilacın parenteral formu yoktur, etki başlaması geçtir ve oral alımda bioyararlanım düşüktür. İRH'nın önlenmesi için kullanılabilecek bir ajanda tam tersi özelliklerin bulunması gereklidir.

Verapamil Ca^{+2} kanal blokajı yanında, alfa reseptör blokajına da yol açarak periferik vazodilatasyon yapar.

Verapamilin i.v. formu vardır, etki başlama süresi yaklaşık beş dakikadır ve plazma yarılanma süresi yaklaşık altı saattir.⁵⁴ Yüzde doksan plazma proteinlerine bağlanır.⁵⁴ Yüzde yetmiş böbreklerden atılır.⁵⁴ Reperfüzyon hasarının temel patolojisinin dakikalar içinde geliştiği düşünüldüğü zaman hızlı etkinin bu hasarın önlenmesinde önemli olduğu kesindir.⁵⁴

Reperfüzyon Hasarı Değerlendirilmesi:

Reperfüzyon hasarının iskelet kasındaki değerlendirilmesi için myeloperoksidaz (MPO) ve malonildialdehit (MDA) seviyesi ölçümü kantitatif değer taşımaktadır.⁸⁵ MDA, lipid peroksidasyonunda son üründür ve miktarı serbest oksijen radikali miktarını gösterir.¹⁰ MPO ise lökositlerden salınır ve lökosit birikiminin spesifik göstergesidir.¹⁰ SGOT, SGPT, LDH kullanılan diğer biyokimyasal parametrelerdendir.⁹

Antioksidan mekanizmanın değerlendirilmesi için plazma total tiol miktarı, GPx ve SOD lmleri yapılabilir. Ayrıca CPK, myoglobulin, doku pH değişiklikleri diğer biyokimyasal parametrelerdendir.

Histolojik olarak, triphenyltetrazoliumchlorid (TTC), nitrobluetetrazolium (NBT), hemotoksilen-eosin ile boyama, kas dokusunda ATP, laktat ve pH değişikliklerinin saptanması, Tc^{99} -pyrophosphate uptake'inin spektrofotometrik olarak ölçülmesi gibi metodlar kullanılır.^{86,87,88,89} Histopatolojik incelemede iskelet kası için nükleolizasyon, çizgilenme kaybı, nötrofil infiltrasyonu, kas demetleri arasında dem gibi parametrelere bakılmaktadır.



Materyal ve Metod

Çalışma Selçuk Üniversitesi Meram Tıp Fakültesi Araştırma Merkezi'nde yapılmıştır. Çalışmada kullanılan hayvanların bakımı 'National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' protokolüne göre yapıldı ve etik kurul onayı alındı.

Çalışmamızda 40 adet, ağırlığı 208-212gr arası Sprague-Dawley tipi erkek rat kullanıldı. Rasgele yöntemle, 10'ar adet ratdan oluşan 4 grup oluşturuldu. Anestezi i.m. ketamin-HCl (50mg/kg) ile yapıldı. Supin pozisyonda ön ve arka ayaklar tespit edildikten sonra, operasyon bölgesi traşlanarak sağ uyluk medialinden transvers insizyon yapıldı.

1.Grup: Başka hiçbir uygulama yapılmadan sadece biopsi alındı. (Sham grup). Biopsi rat arka bacak posterior kompartman üzerinden uzunlamasına insizyonu takiben kasları proksimal ve distal yapışma yerlerinden tamamen kaldırılarak alınmıştır.

2.Grup: Femoral arter ve ven bulunup inguinal ligamentin altında ortaya kondu. Daha sonra cilt insizyonu çepeçevre uzatıldı. Uyluk etrafındaki tüm kas dokuları ve siyatik sinir kesildi ve femur osteotomize edildi. Femoral arter ve ven kleplendi (A₂, V₂ Medikon, Germany) ve femoral sinir kesildi. Ekstremit 150 dk.lık iskemik sürece tabi tutuldu. Bu sürenin sonunda klemler açıldı ve 20 dk. perfüzyon yapıldı. Takiben 1. grupta aynı metodla biyopsi yapıldı. (Kontrol grubu)

3.Grup: İkinci gruptakilerle aynı işleme tabi tutuldu. Bu grupta iskemi oluşturulmadan 5 dakika önce 0.2 mg/kg⁹⁰ olacak şekilde verapamil intraperitoneal olarak verildi. (İskemik öncesi tedavi grubu)

4.Grup: İkinci gruptakilerle aynı işleme tabi tutuldu. Bu grupta klemler açılmadan, yani reperfüzyondan 5 dakika önce 0.2 mg/kg dozda verapamil intraperitoneal olarak verildi. (Reperfüzyon öncesi tedavi grubu)

İskemi oluşturulan gruplarda (grup 2, 3, 4) klemp distalinden yapılan manuel dopler (DWL Multidop MDPF 60770, Germany) ile kan akımının tamamen kesildiği ve klempler aıldıkdan sonra kan akımının tekrar geri geldiği teyid edildi.

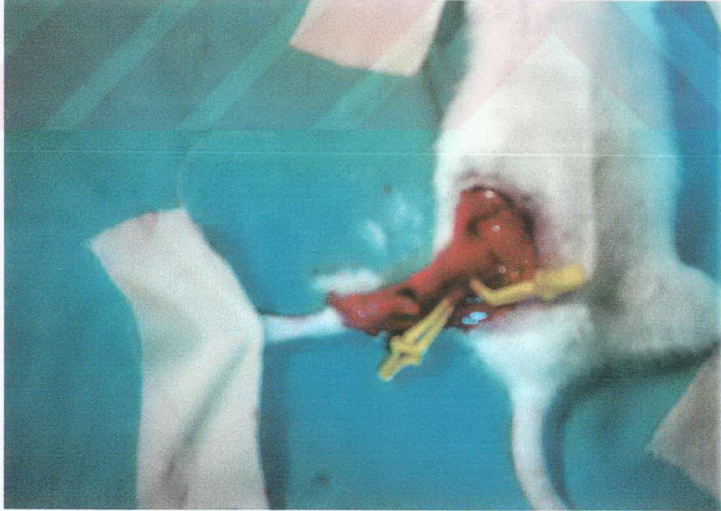
Tüm hayvanlar deneyi canlı olarak tamamladılar ve biyopsi sonrasında femoral vene verilen pentotal ile sakrifiye edildiler. Biyopsi işlemlerinden sonra tüm gruplardan elde edilen dokular eşit iki parçaya ayrılarak iki ayrı kaba alındı. Biokimyasal işlemler bekletilmeden hemen yapıldı. Histoloji için ayrılan parçalar ise özel saklama solüsyonuna konuldu. (PH 7,4 formüllü solüsyon)



Resim 1 :Cilt insizyonu görölmektedir.



Resim 2: Femoral arter ve ven inguinal ligament altında klempe edilmiştir.



Resim 3:Damarlar klemplendikten sonra tüm uyluk çevresinde yumuşak dokular kesilmiştir.



Resim 4:Uyluk çevresi yumuşak dokular kesildikten sonra, femur osteotomize edilmiştir.

Biokimyasal İnceleme : Doku MDA Tayini (Uchiama Mihara Yöntemi)

Dokular 150 mM soğuk KCl kullanılarak % 10'luk homojenat oluşacak şekilde homojenize edildi. Mikroprotein çalışıldı.

Tüpe 1 ml % 10'luk doku homojenatı + 0.08 ml % 0.01'lik BHT + 3 ml fosforik asit + 1 ml % 0.6'lık TBA konuldu, vortexte karıştırıldı. Kaynar suda 45 dk kaynatıldı. Soğuduktan sonra 4'er ml butanol eklenildi. 532 nm'de okuma yapıldı. Kör numune yerine KCl konur diğer işlemler aynen yapıldı. MDA düzeyi ml'de nmol olarak belirlendi.

Histopatolojik İncelemeler:

Preparatlar H+E, Krossmann'ın Triple boyası ve Pappenheim boyası ile boyandı. İlk incelemelerden sonra gruplar arası fark olmadığı için sadece H+E ile çalışılmış preparatlar çalışmaya dahil edildi.

H+E ile boyanmış preparatları 5 katlığında kesitler şeklinde hazırlanıp ışık mikroskopisi ile incelendi.

Histolojik incelemelerde Nevalenien kriterleri kullanıldı ve nükleolizasyon, eozinofili, çizgilenme kaybı, nötrofil infiltrasyonu açısından değerlendirilme yapıldı. Nükleolizasyona immersiyon metodu ve 100x büyütme ile, diğer parametrelere de 40x büyütme ile bakıldı. Her preparatta 15 farklı alan incelenerek nükleolizasyon + veya - ; diğer parametreler ise ağırlığına ve yaygınlığına göre +, ++,+++ olarak değerlendirildi. İncelemenin sonucunda da bazı hücrelerin eozinofili açısından daha farklı boyanma özelliği gösterdiği patolog tarafından bildirilmiş ve ilk kez Nevalenien kriterlerine ilaveten farklı bir parametre olarak kullanılmıştır.

İstatistik İnceleme:

Gruplar arasında parametreler açısından farkı test etmek için Kruskal-Wallis testi kullanıldı. $p<0,05$ değeri anlamlı kabul edildi. Daha sonrada grupların kendi içlerinde karşılaştırılması için Mann Whitney - U testi yapılmıştır.

BULGULAR

İncelen parametrelerin örneklere göre dağılımı yapılmıştır.

Tablo 1:İncelenen tüm parametrelerin örneklere göre dağılımı.

Sıra	Nükleolizasyon	Eosinofili	Çizgilenme kaybı	Nötrofil infiltrasyonu	MDA* nmol/ml
1.	+	-	-	-	0,42
2.	+	-	+	-	0,63
3.	-	-	+	-	0,40
4.	-	-	+	+	0,64
5.	-	-	-	-	0,57
6.	-	-	-	-	0,40
7.	+	-	-	-	0,64
8.	-	-	+	-	0,47
9.	-	-	++	-	0,36
10.	-	-	-	-	0,40
11.	+	+	++	++	0,70
12.	+	++	+++	+	0,75
13.	+	++	++	++	0,69
14.	+	++	++	+++	0,75
15.	+	++	++	+	0,70
16.	-	+++	++	++	0,80
17.	+	++	+++	++	0,70
18.	+	+++	++	+	0,63
19.	+	++	++	+++	0,81
20.	+	++	+++	++	0,75
21.	-	++	+++	+	0,61
22.	-	++	+++	++	0,56
23.	-	++	+++	+	0,52
24.	+	+	++	++	0,61
25.	+	+	+++	+	0,51
26.	+	++	++	++	0,63
27.	+	++	+++	+	0,57
28.	-	++	+++	++	0,58
29.	-	++	+++	+	0,54
30.	-	++	+++	+	0,55
31.	+	++	++	-	0,71
32.	+	+	+++	+	0,82
33.	+	+	+++	+	0,83
34.	+	+	++	+	0,77
35.	+	+	+++	+	0,68
36.	+	+	+++	+	0,75
37.	+	++	++	-	0,70
38.	+	+	++	+	0,65
39.	+	+	+++	+	0,68
40.	+	+	+++	+	0,62

*MDA: Malonildialdehit

Gruplar arasında tüm parametreler açısından fark tespit edilmiştir.

($p<0,05$)

Tablo 2 : Tüm parametreler açısından grupların karşılaştırılması.

	nükleolizasyon	eozinofili	Çizgilenme kaybı	Nötrofil infiltrasyonu	MDA*
Grup 1	0,3	0,0	0,5	0,1	0,49
Grup 2	0,8	2,1	2,3	1,9	0,72
Grup 3	0,4	1,8	2,8	1,4	0,56
Grup 4	1	1,2	2,6	0,8	0,72
P	0,003	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

*MDA: Malonildialdehit

$P<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

Grup 1 ve 2 arasında tüm parametreler açısından anlamlı fark bulunmuştur. ($p<0,05$)

Tablo 3: Grup 1 ve 2'nin tüm parametreler açısından karşılaştırılması

	nükleolizasyon	Eozinofili	Çizgilenme kaybı	Nötrofil infiltrasyonu	MDA*
P	0,028	0,0001	0,0001	0,0001	0,0001

*MDA: Malonildialdehit

$p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

MDA ve çizgilenme kaybı 3. grupta 2. gruba göre anlamlı derecede azalmıştır. ($p<0,05$)

Tablo 4: 2. ve 3. grubun tüm parametreler açısından karşılaştırılması.

	Nükleolizasyon	Eozinofili	Çizgilenme kaybı	Nötrofil infiltrasyonu	MDA*
P	0,075	0,195	0,028	0,112	0,0001

*MDA: Malonildialdehit

$p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

İkinci grup eozinofili ve nötrofil infiltrasyonu açısından 4. gruba göre anlamlı olarak daha yüksektir. Diğer parametreler açısından fark yoktur. ($p<0,05$)

Tablo 5: 2. ve 4. grubun tüm parametreler açısından karşılaştırılması.

	Nükleolizasyon	Eozinofili	Çizgilenme kaybı	Nötrofil infiltrasyonu	MDA*
P	0,146	0,02	0,189	0,001	0,760

*MDA: Malonildialdehit

$p<0,05$ anlamlı kabul edilmiştir.

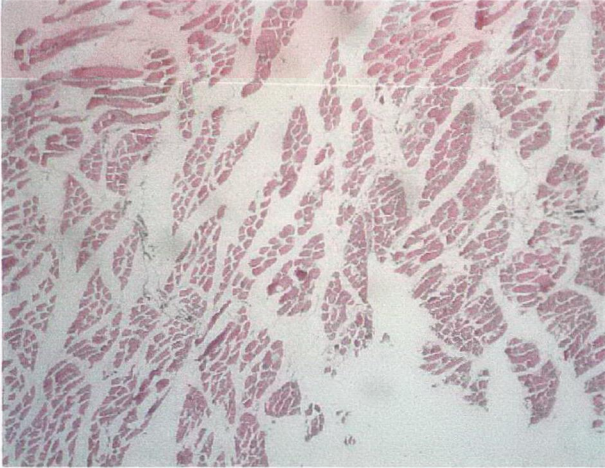
MDA ve nükleolizasyon 4. grupta anlamlı olarak fazla iken eozinofili ve nötrofil infiltrasyonu 3. grupta anlamlı olarak daha fazladır. ($p<0,05$)

Tablo 6: 3. ve 4. grubun tüm parametreler açısından karşılaştırılması.

	Nükleolizasyon	eozinofili	Çizgilenme kaybı	Nötrofil infiltrasyonu	MDA*
P	0,004	0,009	0,342	0,015	0,0001

*MDA: Malonildialdehit

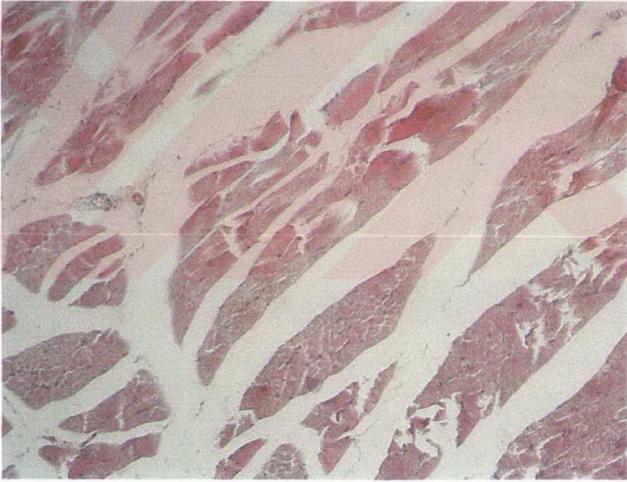
$p<0,05$ anlamlı olarak kabul edilmiştir.



Resim 5: Grup 1'den alınan biyopsinin H+E ile boyanmış hali.

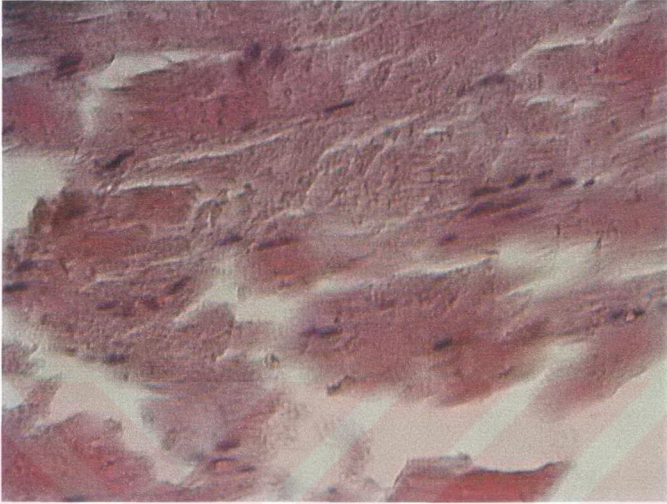


Resim 6:N kleolizasyona  rnek.

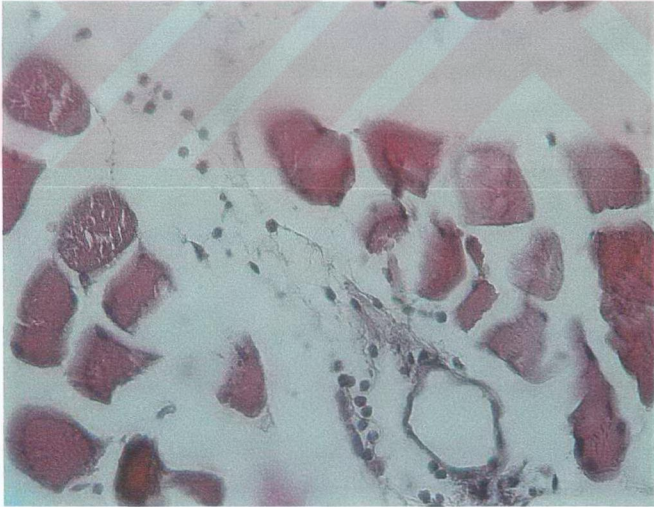


Resim 7: izgilenme kaybına  rnek.

T.C. Y NSEK GRETİM KURULU
DOK MANTASYON MERKEZİ

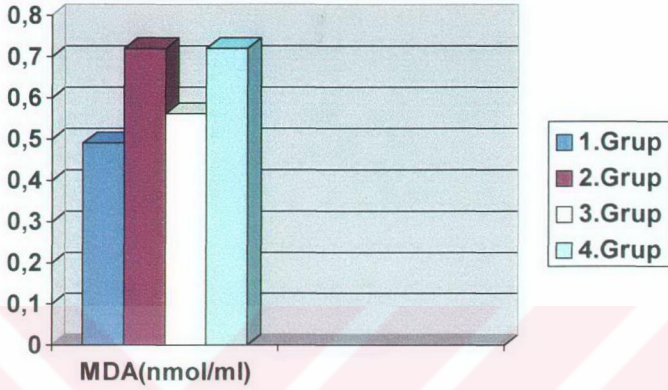


Resim 8:Eozinofili ve çizgilenme kaybına örnek.

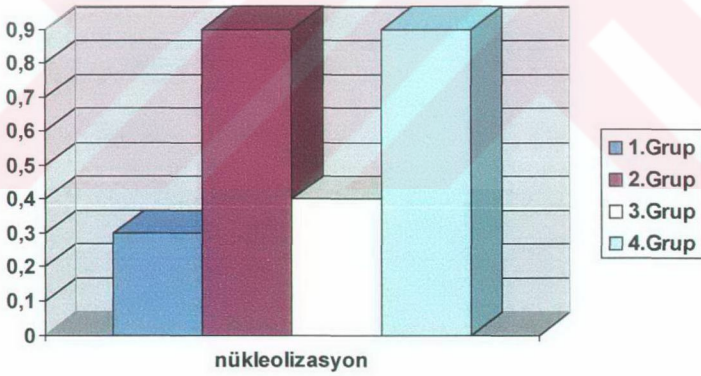


Resim 9:Nötrofil infiltrasyonuna örnek.

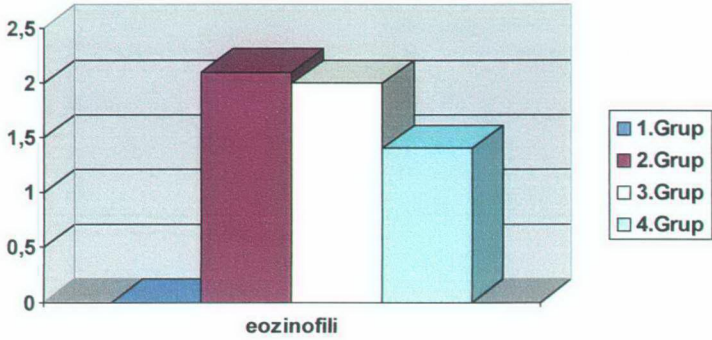
GRAFİKLER



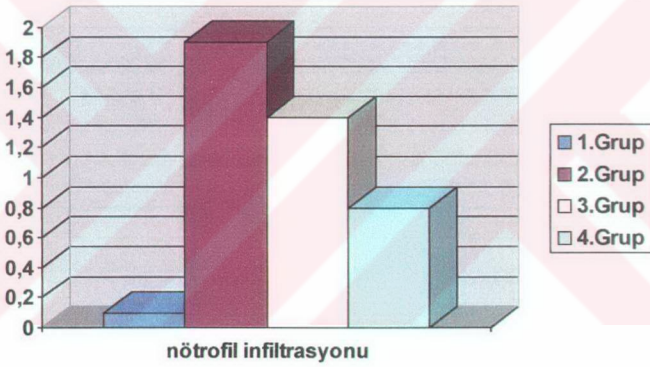
Grafik 1:MDA'nın gruplara göre dağılımı



Grafik 2:Nükleolizasyonun gruplara göre dağılımı.



Grafik 3:Eozinofilinin gruplara göre dağılımı.



Grafik 4:Nötrofil infiltrasyonunun gruplara göre dağılımı

TARTIŞMA

İRH ile ilgili yapılan bir çalışmada deneysel modelde gerçek anlamda İRH oluşturulabilmelidir. Ratlarda alt ekstremité beslenmesi eksternal iliak arter(femoral arter), internal iliak arter (internal pudental ve inferior gluteal) ve superior gluteal arterler yoluyla olmaktadır.⁹ Dolayısıyla sadece femoral arter ve venin bağlanması gerçek ve yeterli bir iskemi modeli oluşturamayacaktır. İdeal bir alt ekstremité deneysel iskemi modeli abdominal aortada iliolumbal arter distalinden dolaşımın tamamen kesilmesiyle mümkündür.⁹ Yukarıda belirttiğimiz üç ana arterin siyatik sinir üzerinde anastomozları vardır.⁹ Bu yüzden alt ekstremitéde iskemi oluşturabilmek için abdominal aortodan dolaşım blokajı yapılmalıdır. Alt ekstremitéde turnike ile yapılan iskemi modellerinde ise ekstremité boşaltılması ve manometre olsa bile standart kompresyonun şüpheli olması, ve tüm ekstremitelerde turnike yüksekliğinin aynı seviyede ayarlanamayacak olması nedeniyle oluşacak modelin standardizasyonu şüpheli olacaktır. Biz Ünal'ın⁹¹ çalışmasındaki metodu kullandık. İskemi, ekstremitenin sadece femoral arter-ven bağlantısı kalacak şekilde kesilmesi ve damarların klemplenmesi ile oluşturuldu. Kan akımının tam olarak kesildiği manuel dopler incelemeyle gösterildi. Klemplerin damar intimasında hasar oluşturmaması gerekmektedir. Zira, intimal hasar endotelyal sitokin salınımını uyarak ayrı bir hasar oluşumuna neden olabilir. Bu sebeple daha önceki çalışmalarda kullanılan ve intima hasarına yol açmayacak düzeyde basınç uyguladığı gösterilen klempleri tercih ettik⁹¹. Dopler inceleme klemplerin açılmasından sonra da yapılmış, akımın geri geldiği gösterilmiştir. İRH'na ait tüm parametrelerin ikinci grupta birinci gruba göre anlamlı derecede yüksek olması modelin iskemi oluşturmadaki etkinliğinin bir göstergesi olarak değerlendirilebilir. (p<0,05)

Ratlarda 150 dakikalık alt ekstremité iskemisinden sonra yapılan reperfüzyonda reaktif hiperemik akımın 20 dakika sürdüğü ve 20 dakikadan sonra akımın normal haline döndüğü gösterilmiştir.⁹¹ IRH'nın en şiddetli olduğu dönem bu reaktif hiperemik akım dönemidir⁹¹. Bu nedenle çalışmamızda 150 dakikalık iskemi ve 20 dakikalık reperfüzyon uygulanmıştır.

Son yıllarda ortopedi ve travmatoloji uygulamalarında serbest doku transferleri sıkça kullanılır olmuştur. Dolayısıyla IRH'nın da önemi artmıştır. IRH'nın önceden beklendiği durumlarda profilaksi uygulanması mümkündür. Kompartman sendromu ve amputasyon gibi yaralanmalarda ise iskemik süreç zaten başlamıştır. Bu sebeple IRH'nın önlenmesindeki etkinliğini araştırdığımız verapamili iki farklı grupta inceledik. Iskemi öncesi tedavi grubunda serbest doku transferlerinde olduğu gibi önceden beklenen hasarı, reperfüzyon öncesi tedavi grubunda ise kompartman sendromu veya replantasyon cerrahisindeki gibi zaten iskemik yaralanmanın mevcut olduğu durumlardaki hasarı çalışmayı amaçladık. Reperfüzyon hasarına uğrayacak her hücre iskemik bir hücredir ve iskemik hücrenin metabolizması normal hücreden farklıdır.⁹² Bu nedenle iskemik hücrenin bir ilaca reaksiyonu normal bir hücreden farklı olabilir. Bu da çalışma gruplarını oluştururken dikkate aldığımız bir diğer faktördür.

Ratlarda intra peritoneal ilaç verimi ile intra venöz ilaç verimi arasında etki başlama süresi açısından bir fark yoktur.⁹² Verapamilin etki başlama süresi yaklaşık 5 dakikadır ve etkin dozu 0,2 mg/kg'dır.⁵⁴ Bu sebeple üç ve dördüncü gruplarda ilaç, intraperitoneal olarak ve iskemi ve reperfüzyondan 5'er dakika önce verilmiştir. Ayrıca damar kateterizasyonu yapılması endotelial sitokin salınımlarını etkileyerek deneysel model güvenliğini tehlikeye sokabilir. Bu da intraperitoneal yolu tercih etmemizin bir diğer nedenidir.

İRH tespitindeki biyokimyasal uygulamalar çeşitlidir. MDA, İRH tespitinde yaygın kullanılan ve güvenilir bir parametredir. MDA lipid peroksidasyonunda son üründür ve miktarı serbest oksijen radikali miktarını gösterir.¹⁰ Biz MDA ölçümünü güvenilirliğini arttırmak için serum yerine doku homojenizasyon cihazı kullanarak direkt olarak iskelet kasında yaptık.

Genel bilgiler bölümünde de belirttiğimiz gibi iskelet kası İRH'da histopatolojik incelemenin hem boya açısından hem de incelenen parametreler açısından belli bir standardizasyonu vardır. Bizim çalışmamızda pek çok çalışmada kullanılmış olan H+E ve bunun yanında Krossmann'ın Triple boyası ve Pappenheim boyası da kullanılmıştır. Ancak, son iki boya metodu ile yapılan incelemelerde araştırdığımız parametreleri tespit konusunda yetersiz oldukları görülmüş ve çalışma dışı bırakılmışlardır. Çalışmamızda histopatolojik inceleme sırasında Nevalenien kriterlerine uygun parametreler dışında bazı preparatlarda yoğun eozinofili görülmüş ve gruplar arasında bu yönde bir farkın varlığı da araştırılmıştır. Bir ve ikinci gruplar arasında eozinofili parametresi anlamlı olarak farklı bulunmuştur. ($p < 0,05$) . Bu parametrenin İRH'ndaki belirleyici rolü başka çalışmalarla da teyid edilmelidir.

Üçüncü grupta verapamil ile MDA düzeylerinin düştüğünü ve çizgilenme kaybının azaldığını gördük. Ancak diğer parametreler üzerinde verapamilin anlamlı bir etkisi saptanmadı. ($p > 0,05$) Verapamilin bu etkilerini 4. grupta tespit edemedik. Tam tersi olarak MDA ve çizgilenme kaybı farklılık göstermemiş ancak 3. grupta değişmemiş olan eozinofili ve nötrofil infiltrasyonu 4. grupta anlamlı derecede azalmıştır. ($p < 0,05$)

İRH'nda serbest radikaller aracılığı ile olan hücre duvarı lipid peroksidasyonu en önemli hasar mekanizmasıdır.¹ Bunun yanında serbest radikaller enzim denatürasyonu, DNA hasarı, tiol bileşiklerinin

hasarı, sarkolemma ve sarkoplazmik retikulum disfonksiyonu ve direkt damar endoteli hasarı da oluşturabilmektedirler.^{2,3,12,13,14,15}

Lipid peroksidasyonunun direkt göstergesi olan MDA düzeylerine bakıldığında, verapamilin iskemi öncesi tedavi grubunda, lipid peroksidasyonunu , kontrol grubu ve reperfüzyon öncesi tedavi grubuna göre azalttığı görülmüştür. Bu verapamilin İRH'da koruyucu bir rol oynayacağını düşündürebilir. Ancak patolojik parametrelere bakıldığı zaman lipit peroksidasyonu azalmış olsa bile İRH'nın önlenmediği söylenemez. Acaba neden İRH'ındaki en önemli olay yani lipit peroksidasyonu azaldığı halde patolojik bulgular bunu teyid etmemektedir? İRH azaltılması için yapılan pek çok çalışmada karaciğer, kalp, deri, böbrek gibi organlarda lipid peroksidasyonu azalmasına hücre hasarındaki azalma eşlik etmektedir.⁹² Ancak, bizim çalışmamızda bu paralellik gözlenmemiştir. Bu da iskelet kasında İRH'ında lipit peroksidasyonu dışındaki mekanizmaların daha önemli olabileceğini akla getirmektedir. Verapamilin periferik vazodilatasyon ve iskemi oluşturunca etkisi de bilinmektedir.⁵⁴ Verapamil acaba reperfüzyon yaralanmasını bilinen metotla azaltırken iskemik yaralanmayı arttırmakta mıdır? Verapamilin iskemi öncesi ve reperfüzyon öncesi verilmesinin farkını ortaya koymak için çalışmanın son iki grubunda niceliksel ölçülmüş dopler sonuçlarına ihtiyaç vardır. İki grubun reperfüzyon dönemindeki akım hızlarının ölçülmesi gerçek anlamda iskemi ve reperfüzyon dan sonra meydana gelen patolojik değişiklikleri anlama, anlamlandırma ve değerlendirmede faydalı olacaktır.

İskelet kasındaki iskemide geri dönüşümsüz patolojik bulgular elektron mikroskopisi ile 30 dakikadan sonra tespit edilebilirken, ışık mikroskopisiyle bu bulgular 3 saatten sonra görülebilmektedir.⁹¹ O yüzden 150 dakikalık iskemi sonrası yapılan reperfüzyon ile oluşan hücresel hasarın reperfüzyona bağlı olması olasılığı daha güçlüdür.

Verapamil ile yaptığımız bu çalışma sonucunda İRH'nin azaltılmasında iskemi öncesi verilen verapamilin lipid peroksidasyonunu ciddi olarak azalttığını tespit ettik. Ancak lipid peroksidasyonundaki azalmaya patolojik bulgular eşlik etmedi. Dolayısıyla cilt, kalp gibi reperfüzyon hasarına çizgili kastan daha duyarsız yapılarda lipid peroksidasyonu dışındaki hasar mekanizmaları nispeten daha önemsiz iken iskelet kasında daha önemli hale geldiği kanaatini edindik.

İRH'nin önlenmesinde pek çok dokuda etkin olan verapamil iskelet kasında bu etkiye sahip değildir.



KAYNAKÇA

1. Kerrigan CL, Stotland MA: Ischemic reperfusion injury : A review. microsurgery 14:165,1993
2. Godio AS: Oxygen – derived free radicals in plastic surgery : Therapeutic interest of fighting free radicals : Superoksid dismutase. Eur. J. Plast. Surg 12:111,1989
3. Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Mesmer K: Microvascular ischemia reperfusion injury in striated muscle: Significance of reflow paradoks Am. J. Physiol. 263:H1901,1992
4. Schmid – Schönbeim GW: Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. Fedaration proc 46:2397,1987
5. Granger, D.N, Korthius,R.J: Physiologic mechanisms of post ischemic tissue injury, Annu. Rev. Physiol. 57, 311-312 1995
6. Beyersdort F, Unger A, Wildhirt A: Studies of reperfusion injury in skeletal muscle preserved cellular viability after extended periods of warm ischemia. J. Cardiovasc. Sur. 32:664,1991
7. Petrasek PF, Homer – Vanniasinkam S, Walker PM: Determinant of ischemic injury to skeletal muscle. J. Vasc. Surg. 19:623,1994
8. Thomas Lee H, Lineaweaver WC: Protection against ischemic – reperfusion injury of skeletal muscle: Role of ischemic preconditioning and adenosine pretreatment. J. reconst. Microsurgery. 12:383,1996
9. NO donör ve inhibitörlerinin periferik sinir iskemi reperfüzyon hasarına etkileri. Hale SAYAN, Ankara 2001.
10. Cutm JC, Pernelli MG, Cavaliari B, Perelta C. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of

ischemic preconditiony. Free radic.biol. 2002 33(9) :1200-8.

Review

11. Okajima K, Harada M, Kushimoto S, Uchiba M. Role of the microtrombus formation in the development of ischemia-reperfusion . Thromb. Haemost.2002 88(3)473-80
12. Long JW, Laster IL, Stevens RP: Contractile and metabolic function following an ischemia reperfusion injury in skeletal muscle: influence of oxygen free radical scavengers. Microcir. Endoth. Jymphatics 5:351,1989
13. Picard – ami LA, Mackay A, Kerrigan CL: Effect of allopurinol on the survival of experimental pig flaps plas. Rekonst. Surg 89:1098,1992
14. Smith JK, Grisham MB, Granger DN, Korthius RJ: Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in post – ischemic skeletal muscle Am. J. Physiol. 256:H789,1989
15. Yokata J, Minei JP, Fantini GA, Shires GT: Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia. Am. J. Physiol. 257:H1068,1989
16. Halliwell B,:oxidants and the central nervous system:some fundamental questions, Acta Physiol. Scand.,126,23-33 1989
17. Ji L.L,:Antioxidant enzymes response to exercise and training in the sceletal muscle ‘Oxidative stress in sceletal muscle’ s:103-117,Birkhauser Verlag Basel,Switzerland.1998.
18. Grace PA: ischemia-reperfusion injury Br.J .Surg.81,637,-47 1994
19. Halliwell B,Gutteridge JMC:The antioxidants of human extracelluler fluids, Arch. Biocem. Biophysiol.280,1-8 1990

20. Im MJ, Manson PN, Bulkeley GB, Hoopes JE: Effects of superoksid dismutase and allopurinol on the survival of acute island skin flaps. *Ann. Surg* 201:357,1985
21. Sagi A, Ferder M, Levens D, Strauch B: Improved survival of island flaps after prolonged ischemia by perfusion with superoksid dismutase. *Plast. Reconst. Surg.* 77:639,1986
22. Warner,HB,:superoksit dismutase ,aging and degeneratif disease, *Free radic.and Biol.med* 17,249-53 1994
23. Smith KJ,Carden DL; Korthius RJ,:Role of ksantin oksidase in post ischemic microvascular injury in sceletal muscle , *Am, j Physiol* h1782-89 1989
24. Smith JK, Grisham MB, Aw TY: free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in post ischemic muscle. *Am. J. Physiol* 256:H789,1989
25. Oredson S,Plate G,Vardfordt P:experimental evaluation of oxygen free radical scavengers in the prevention of reperfusion injury in sceletal muscle ,*Eur j Surg* 160,97-103.1994
26. Walker PM,: ischemia-reperfusion injury in sceletal muscle , *Ann.Vasc.Surg.*5, 399-402.1991
27. Faust KB, Chiantella V,Vinten Johansen J, meredith JH:Oxygen-derived free radical scavengers and sceletal muscle ischemia-reperfusion injury *American Surgeon*, 54,70719 1988
28. Bozkurt AK. Alfa tokoferol and iloprost attenuate reperfusion injury in sceletal muscle ischemia reperfusion.*J Cardiovas.surg.*2002 43(5) :6936
29. Welbourn CRB,Golman G,Paterson IS,Valeri CR,Shepro D,Hectman HB,:pathophysiology of ischemia reperfusion injury:central role of the neutrophil,*Br. J.surg.*78 651-55 1991

30. Yoshida K, Yoshimura K, Honiude M: L-Arginin inhibits ischemia reperfusion lung injury in rabbits J.surg. res. 85,9-16.1999
31. Ernster L. Biochemistry of reoxygenation injury :Crit care med ,16:947-953,1988
32. Rubin BB, Romaschin A, Walker PM, Gute DC, Korthuis RJ,: Mechanism of postischemic injury in skeletal muscle: Intervention strategies, J. Appl. Physiol. 80(2), 369-87. 1996
33. Williamson JR, Cooper RK, Hoek JB :Role of calcium in the hormonal regulation of liver metabolism. Biochim. Biophys. Acta 639;243-295,1981
34. Marcus BC, Wyble CW, Hynes KL, Gewertz BL, Cytokine induced increases in endothelial permeability occur after adhesion molecule expression ,Surgery,120(2),411-16 .1996
35. Gute DC, Ishida J, Yarimizu K, Korthuis RJ: inflammatory responses to ischemia reperfusion in skeletal muscle,179(1-2),169-187.1998
36. Lindsay TF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM,:The effect of the ischemia -reperfusion on adenine nucleotide metabolism and ksantin oxidase production in skeletal muscle , j Vasc Surg.12(1). 1990
37. Suematsu M ,De Lano , Poole D, Engler RL, Miyasaka ML,:Spatial and temporal correlation between leucocyte behaviour and cell injury in postischemic rat skeletal muscle microcirculation ,lab.invest.70(5),684-95.1994
38. Carden DL, korthuis RJ,:Proteaz inhibition attenuates microvascular dysfunction in post ischemic skeletal muscle. Am. J. Physiol.271 1996

39. Carden DL, Smith K, Korthuis RJ: neutrophil-mediated microvascular dysfunction in postischemic canine skeletal muscle. Role of granulocyte adhesion. *Circ. Res.* 66:1436-44 1990
40. Petrasko PF, Lindsay TF, Romaschin AD: plasma activation of neutrophil CD18 after skeletal muscle ischemia: A potential mechanism of late systemic injury. *Am. j. Physiol.* 270: H1515-20 1996
41. Cambria RA, Anderson RJ, Dikran G, Techan EP, Hernandez-meldonado JJ, Hobson RW, Leukocyte activation in ischemia reperfusion injury of skeletal muscle, *J. Surg. res.* 51:13-17 1991
42. Belkin M, Lamorte WL, Wright JG; Hobson RW: the role of leukocytes in pathophysiology of skeletal muscle ischemic injury, *J. Vasc. Surg.* 10(1):14-18 1989
43. Petrasko PF, Liauw S, Romaschin AD, Walker PM: Salvage of postischemic skeletal muscle by monoclonal antibody blockade of neutrophil adhesion molecule . CD18, *J Surg res* 56:5-12 1994
44. Schoenberg MH, Beger HG : Reperfusion injury after intestinal ischemia. *Crit. Care. Med.* 21:1376, 1993
45. Kubes P, Jutila M, Payne D: Therapeutic potential of inhibiting leukocyte rolling in ischemia reperfusion *J clin invest* 95:2510, 1995
46. Dolan RW, Kerr DC, Arena S: improved reflow and viability in reperfused ischemic rat island groin flaps using dexamethasone. *Microsurgery* 16:86, 1995
47. Weiss SJ, Tissue destruction by neutrophils. *N engl J med* 320:365, 1989
48. Forbes TL, Carson M, Harris KA, DeRose G, Jamieson WG, Potter RF: Skeletal muscle injury induced by ischemia reperfusion. *C J S* 38:56, 1995

49. Jerome SN, Akimitsu T, Korthius RJ: leukocyte adhesion edema and development of post ischemic capillary no-reflow. Am J physiol 266:H1329,1994
50. Jerome SN,Dore M, Paulson JC, Smith CW, Korthius RJ:P-selectin and ICAM-1 dependent adherence reactions:role in the genesis of postischemic no-reflow.Am J Physiol 266:H1316,1994
51. Korthius RJ, Grisham MB, Granger DN: leukocyte depletion attenuates vascular injury in postischemic skeletal muscle Am J Physiol 254:H823,1988
52. Richardson M, Berker A, Roberts A: In vivo microscopy of rat skeletal muscle after ischemia using labeled neutrophils (PMN). J Surg Res 53:563,1992
53. Potter RF, Dietrich H, Tyml K:Ischemia-reperfusion induced microvascular dysfunction in skeletal muscle: application of intravital videomicroscopy.Int J Microcirc Clin Exp 13:173,1993
54. Katzung farmakoloji 1998
55. Wink DA; Mitchell JB; Chemical biology of nitric oxide :Insights into regulatory,cytotoxic,and cytoprotective mechanism of nitric oxide ,free radic.biol. med.25(4/5),434-56.1988
56. Patel VC,Yellon DM , Singh KJ; Neild GH; Woolfson RG,Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the in situ rabbit heart, Biochem. Biophysiol.Res.Comm. 194,234-243 1993
57. Wildhirt, SM, weismueller S, Schulze C, Conrad N, Kornberg A, Reichart B: Inducible NO synthase activation after ischemia reperfusion contributes to myocardial dysfunction and extends of infarct size in rabbits: Evidence
58. Knox LK, Steward AG, Morrison WA:nitric synthase inhibitors improve skin flap survival in the rat,microsurgery 15, 708-11,1994

59. Phan LH, Hickey MJ, Niazi ZBM, Steward AG: The nitric oxide synthase inhibitor, nitroiminoethyl-L Ornithine reduces ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle Microsurgery, 15, 703-707 1994
60. Zhang B, Knight KR, Dowsing B, Guida E, Phan LH, Hickey MJ, Morrison WA, Steward AG : Timing administration of dexamethasone or the nitric oxide synthase inhibitor, nitro-L arginine methyl ester is critical for effective treatment of ischemia reperfusion injury to rat skeletal muscle, clinical science, 93, 167-174 1997
61. Kurose I, Kubes P, Wolf R.: inhibition of nitric oxide production mechanism of vascular albumin leakage, circ.res. 73, 164-175 1993
62. Payne D, Kubes P.: nitric oxide donors reduce the rise in reperfusion induced intestinal mucosal permeability, Am. J. Physiol, 265, G189-194
63. Gaboury J, Woodman R, Granger DN: Nitric oxide prevents leukocyte adherence : role of superoxide, Am. J. Physiol. 265, H 862-867 1993
64. Cordeiro PG, Santamaria E, Hu QY.: use of nitric oxide precursor to protect pig myocutaneous flaps from ischemia reperfusion injury, Plat.Reconst.Surg. 102, 2040-47 1998
65. Kurose I, Wolf R, Grisham MB, Granger ND.: modulation of ischemia reperfusion –induced microvascular dysfunction by nitric oxide Circ. Res. 74, 376-82 1994
66. Jerome SN, Akimutsui T, Korthuis R.: Leukocyte adhesion, edema, and development of postischemic capillary no reflow, Am. J. Physiol, 267, H1329-36 1994

67. Lopez – Neblin F, Toledo – Pereyra LH, Mirmiran R, Paez – Rollys AJ, Time dependence of Na-Nitropruside administration in the prevention of neutrophil infiltration in the rat ischemic kidney, transplantation, 61(2),179-83,1999
68. Aydın İrfan, A ve E vitamininin venöz iskemi reperfüzyon hasarı üzerinde koruyucu etkileri 2001
69. Hernandez LA; Grisham MB; Arfors TK, Harlan JM, Granger DN, Role of neutrophils in ischemia –reperfusion induced microvascular injury Am j physiol 253:H699,1987
70. Alt ekstremitelerde deneysel modelde iloprost ve alfatokofenolün reperfüzyon hasarı önlenmesindeki kullanımı. Ahmet DOĞANCI, İstanbul, 2001.
71. Küçükçelebi A, Özcan M: the beneficial effect of cyclosporin –A on the no flow fenomen in rat skin island flap Br J plas. Surg. 45:512,1992
72. Lee C, Kerrigan CL, Tellado JM, Altered neutrophil function following reperfusion and ischemic myocutaneous flap. Plast. Reconst. surg. 89:916,1992
73. Clark WM, Madden KP ; Rothlein R, Zivin JA,: reduction of central nervous system ischemic injury in rabbits using leukocyte adhesion antibody treatment Stroke 22,877-883 1991
74. Murry CE, Richard VJ, Reimer KA, Jennings SRB: ischemic preconditioning slows energy metabolism and delays ultra structural damage during a sustained ischemic episode. Circ. Res. 66:913,1990
75. Atabay K,: Is controlled gradual reflow of blood to post ischemic tissue beneficial for minimizing reperfusion injury. Plas. Surg. Res. 1994

76. Gürlek A , Suchusterman MA, Evans GRD, Gherardini G,:
Blood flow and microcirculatory changes in an ischemia
reperfusion injury model :experimental study in the rabbit J
Reconst Microsurgery 13:345,1997
77. Hori M , Kitakaze M, Sato H, Takashima S, :staged
reperfusion attenuates myocardial stunning in dogs.Role of
transient acidosis during early reperfusion . circulation
84:2135,1991
78. Okamoto F, Allen BS, Burkberg GD, Bugyi H, Leaf J,:studied
of controlled reperfusion after ischemia. J
thorac.cardiovasc.Surg.92:613 1986
79. Peng JF, Murpy ML, Colwell K ,Straub KD: controlled versus
hyperemic flow during reperfusion of jeopardized ischemic
myocardium.Am Heart. J 117:515,1989
80. Sato H,Jordan JH;Zhao Z, Sarvotham SS,Vinten
johansenJ:gradual reperfusion reduces infarct size and endothelial
injury but augments neutrophil accumulation.Am. thorac . surg
.64:1099 1997
81. Vinten Johansen J, Buckberg GD, Okamoto F,: studies of
controlled reperfusion after ischemia v.superioruty of surgical
versus medical reperfusion after regional ischemia J Thorac
Cardiovasc. Surg.92 525 1986
82. Wright JG, Belkin M, Hobson RW, Hypothermia and
controlled reperfusion: two non-pharmacologic methods which
diminish ischemia – reperfusion injury in skeletal muscle. Microcirc
Endothelium Lymphatics 5:315,1989
83. Hock CE, Ribiero LGT, Lefer AM, Preservation of ischemik
myokardium by a new converting enzyme inhibitor enalaprilik asit
in acut e myocardial infarction Am. Heart. J. 109: 222-228

84. Bolli R, Jeroldi mo, Patel BS, Aruoma OI, Halliwell B,McCay PB 1989, marked reduction of free radical generation and contractile dysfunction by antioxidant therapy begun at the time of reperfusion.circulation.65,607-622
85. Cirillo R, Salvatico E,Aliev G,Prostocimi M:Effect of clorricromene of leukocytes in reperfusion-mediated tissue and vascular injury . J Cardiovasculer Pharmacology 20:969,1992
86. Blebea J, Kerr J, Shumko JZ, Feinberg RN, Hobson RV:Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. J Surg Resc 43:311,1987
87. Cheng HT, Chang H, Lue HJ, Wen CY:Unpredictability of triphenyltetrazolium chloride in staining irreversible ischemia-reperfusion injury in the sceletal muscle of rats.Eur J Surg 162:407,1996
88. Hickey MJ, Hurley JV, Angel MF, O'Brien BM:the responce of the rabbit rectus femoris muscle to ischemia and reperfusion. J Surg Res 53:369,1992
89. Jennische E, Hansson HA:postischemic sceletal muscle injury:patterns of injury in relation to adequacy of reperfusion. Exp Mol pathol 44:272,1986
90. J Reconstr Microsurg. 1996 Apr;12(3):183-7. Limiting impairment of muscle function following ischemia and reperfusion in rabbits.
91. Rat arka bacak iskemi reperfüzyon modelinde kan akımının kademeli verilmesinin reperfüzyon hasarına etkileri. Şakir ÜNAL, Ankara, 1999.
92. Karaciğer iskemi reperfüzyon hasarının önlenmesinde verapamin kullanımının etkinliği. İstanbul, 1997.