



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

TRANSPLANTASYON VE REPLANTASYON SIRASINDAKİ
UZUN İSKEMİ PROBLEMİNİN ÇÖZÜMÜNE DAİR
EKSTRAKORPOREAL DOLAŞIM MODELİ

Dr. Süleyman YILDIZDAL

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

ANKARA
2023



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

TRANSPLANTASYON VE REPLANTASYON SIRASINDAKİ
UZUN İSKEMİ PROBLEMİNİN ÇÖZÜMÜNE DAİR
EKSTRAKORPOREAL DOLAŞIM MODELİ

Dr. Süleyman YILDIZDAL

UZMANLIK TEZİ
Olarak hazırlanmıştır.

TEZ DANIŞMANI
Prof. Dr. Serdar Nazif Nasır

ANKARA
2023

TEŞEKKÜR

Uzmanlık eğitimi sürecimde üzerimde emeği bulunan ve desteklerini esirgemeyen Anabilim Dalı başkanımız Prof. Dr. M. Gökhan TUNÇBİLEK'e;

Uzmanlık tez çalışmamda birlikte çalışmaktan büyük mutluluk duyduğum, bilgi ve tecrübeleriyle yol gösteren tez danışmanım Prof. Dr. Serdar Nazif NASIR'a sabrı ve anlayışı için;

Uzmanlık eğitimim boyunca bilgi ve tecrübelerini paylaşarak mesleğimi ve daha birçok şeyi bana öğreten başta Prof Dr. Figen ÖZGÜR olmak üzere bütün değerli hocalarıma;

Uzmanlık eğitim süresince birlikte çok güzel anılarımın olduğu araştırma görevlisi abi, abla ve kardeşlerime;

Çalışmanın hem deney kısmında hem de veri analizi kısmında yardımcı olan Fizyoloji öğretim üyesi Doç Dr. Bilge PEHLİVANOĞLU, Fizyoloji araştırma görevlileri Özbeyen ATALAY, Deniz ÖNAL'a

Çalışmanın histopatolojik değerlendirme kısmında büyük katkıları olan Dr. Öğr. Üyesi Özay GÖKÖZ ve Dr. Öğr. Üyesi Beril TALİM'e

Yoğun eğitim dönemimde her zaman anlayışlı olup yanımda olduğunu bildiğim hayat arkadaşım Derya'ya;

Sevgilerini ve emeklerini her zaman hissettiğim, beni yetiştirip bu günleri görmemi sağlayan sevgili anneme ve babama;

En içten teşekkürlerimi sunarım.

Dr. Süleyman Yıldızdal

ÖZET

Yıldızdal S., Transplantasyon ve replantasyon sırasındaki uzun iskemi probleminin çözümüne dair ekstrakorporeal dolaşım modeli. Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Plastik Rekonstrüktif ve Estetik Cerrahi Anabilim Dalı Uzmanlık Tezi, Ankara, 2023. Ekstremitte nakilleri ve ekstremitte amputasyonlarının replantasyonu sırasında klasik kompozit doku saklama ve transport yöntemi soğukta saklamadır. Ancak soğukta saklama yöntemi büyük kas kitlesi olan ekstremitelerin taşınmasında güvenli bir saklama süresi sağladığı düşünülürse, uzamış soğukta saklama süresi, dokularda iskemi-reperfüzyon hasarını engelleyememekte ve bu durumda replante veya transplante edilen ekstremitenin fonksiyonunda ve sağkalımında başarısız sonuçlar oluşabilmektedir. Buna alternatif olarak solid organların naklinde perfüzyon amaçlı kullanılmış olan *ex-situ* perfüzyon sistemlerinin, vaskülerize kompozit dokuların nakli sırasında da kullanılması halinde; iskemik kalan dokuda hem yeterli oksijenin sağlanacağı hem sıcaklığın istenilen düzeyde tutulacağı hem de oluşan metabolik yan ürünlerin atılacağı varsayılmaktadır. Böylece oluşacak inflamatuvar yanıtın azalacağı ve replante edilen ekstremitenin fonksiyonunun ve sağkalımının artacağı düşünülmektedir.

Replantasyon/transplantasyon cerrahisindeki iskemi problemine bir çözüm oluşturabilmek için bu çalışmada 2 grup sıçanda, soğukta saklama yöntemi ile *ex-situ* perfüzyon sisteminde saklama yöntemini iskemi-reperfüzyon modeli kullanarak karşılaştırmayı amaçladık. Her iki grupta 6 saat iskeminin ardından 1 saat reperfüzyon yapıldı. Reperfüzyonun ardından alınan gastrokinemius kası doku örneklerinden, cerrahi öncesi ve reperfüzyon sonrası alınan kanlardan elde edilen serum örneklerinden **oksidatif hasar** düzeyini belirlemek amaçlı Enzim Immün Assay (*ELISA*) tekniği kullanılarak biyokimyasal olarak Süperoksid Dismutaz (*SOD*), katalaz, *TAS* (*Total Antioksidan*), *TOS* (*Total oksidan*) ve *Total Thiol* parametrelerine bakıldı. Bunların yanı sıra yine aynı örneklerden *ELİSA* yöntemi ile *TNF- α* , *NF- κ B* ve *IL-10* düzeyleri **inflamasyon** miktarını belirlemek için bakıldı. Ayrıca kanda iskemi-reperfüzyon hasarının yol açacağı inflamatuvar değişimleri göstermek için **biyokimyasal parametreler** (Na^+ , K^+ , *LDH*, *CK*, *Myoglobin* ve *Laktat*) değerlendirildi. Ek olarak sıçan arka bacağından alınan gastrokinemius kasından

ELİSA yöntemi kullanılarak bax ve bcl-2 proteinlerinin düzeyine bakıp **apoptoz** değerlendirildi. Mitokondriyal sitokrom oksidaz (cox) boyaması ve hematoksilin/eozin boyama yöntemleri ile kas lifi hasarı değerlendirildi. Ekstremiteden alınan deri örneklerinden iskeminin cilt bulguları gözlemlendi.

Bulgulara bakıldığında, ekstrakorporeal dolaşım sistemi soğukta saklama sistemine göre oksidatif hasarı daha az oluşturmaktadır. Kas homojenatından ve kandan alınan örneklerden TAS, SOD ve Total Thiol değerleri perfüzyon sisteminde anlamlı olarak daha yüksek bulundu. TOS değeri soğukta saklama sisteminde perfüzyon sistemine göre daha yüksek görüldü. Perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan amputasyon modelinde soğukta saklama sistemine göre inflamatuvar hasar daha düşüktü. İnflamatuvar hasarı gösteren TNF- α , NF- κ B miktarı perfüzyon sisteminde daha düşük görülmüş olup, anti-inflamatuvar özellik gösteren IL-10 miktarı perfüzyon sistemi kullanılan modelde daha yüksektir. Reperfüzyonun geç döneminde oluşan apoptoz ve nekroz bulgularının aksine, bu çalışmada iskemi reperfüzyon hasarının erken dönemi incelendiğinden apoptoz belirteci olan bax ve bcl-2 düzeyleri iki grup arasında farklılık göstermedi. Biyokimyasal parametrelere bakıldığında kas yıkım ürünü olan CK, Myoglobin değerleri ve metabolik yükü gösteren LDH ve laktat değerleri soğukta saklama grubunda perfüzyon grubuna göre daha yüksekti. İskemi reperfüzyon sonrasında ciltte herhangi bir farklılık iki grup arasında yokken; kasta cox boyaması ve hematoksilin/eozin boyaması sonrasında soğukta saklama sisteminde perfüzyon sistemine göre belirgin bir mitokondriyal hasar gözlemlendi.

Sonuç olarak ekstrakorporeal dolaşım modeli soğukta saklama modeline göre inflamatuvar ve oksidatif hasarı erken dönemden itibaren daha fazla önlemektedir. Bu sebeple kas kitlesi büyük olan ekstremitelerin replantasyonu veya transplantasyonunda ekstrakorporeal dolaşım sistemlerinin kullanılması daha başarılı sonuçlar oluşturabilir.

Anahtar Kelimeler: İskemi-Reperfüzyon hasarı, Oksidatif stres, Ekstrakorporeal dolaşım modeli, Soğukta saklama yöntemi

ABSTRACT

Yıldızdal S., Extracorporeal circulation model for solution of the prolonged ischemia time during transplantation and replantation. Hacettepe University Faculty of Medicine. Thesis in Plastic Reconstructive and Aesthetic Surgery Department, Ankara, 2023. The standard composite tissue storage and transportation method during limb transplantation and replantation is cold storage. However, although the cold storage method is thought to provide sufficient time for transportation of extremities with large muscle mass, prolonged cold storage cannot prevent ischemia-reperfusion injury. Consequently, function and survival of the replanted or transplanted extremity can be unsuccessful in prolonged cases of cold storage. Alternatively, if vascularized composite tissues are stored in ex-situ perfusion systems, sufficient oxygen is provided to the ischemic tissue, the temperature of the tissue is kept at the desired level, and the metabolic waste products are eliminated. Therefore, it is thought that the inflammatory response will decrease and the function and survival of the replanted extremity will increase.

In order to find a solution to the ischemia problem in replantation/transplantation surgery, in this study we aimed to compare results of the cold storage method and the perfusion system storage method. Following the institutional review board approval, an experimental study on 2 groups of rats using the ischemia-reperfusion model was performed. Both groups underwent 1 hour of reperfusion after 6 hours of ischemia. Superoxide Dismutase (SOD), catalase, Total Antioxidant Status (TAS), Total Oxidant Status (TOS) and total thiol levels in gastrocnemius muscle and blood samples were biochemically analyzed using the Enzyme Immun Assay (ELISA) technique to determine oxidative damage levels. In addition, TNF- α , NF- κ B and IL-10 levels were measured using the ELISA method in the same samples to evaluate the degree of inflammation. Additionally, biochemical parameters (Na⁺, K⁺, LDH, CK, Myoglobin and Lactate) were analyzed to demonstrate the inflammatory changes caused by ischemia-reperfusion injury in the blood. Apoptosis was evaluated by measuring the levels of Bax and Bcl-2 proteins in gastrocnemius muscle samples, using the ELISA method. Muscle fiber damage was evaluated by mitochondrial cytochrome oxidase

(cox) staining and hematoxylin/eosin staining methods. Skin findings of ischemia were observed from skin samples taken from the extremity.

It was found that the extracorporeal circulation system causes less oxidative damage than the cold storage system. TAS, SOD and Total Thiol levels in muscle homogenate and blood samples were found to be significantly higher in the perfusion system. TOS levels were found to be higher in the cold storage system than in the perfusion system. Inflammatory damage was lower in the perfusion system than in the cold storage system. The amount of TNF- α and NF- κ B, which indicate inflammatory damage, was lower in the perfusion system, and the amount of IL-10, which an anti-inflammatory cytokine, was higher in the perfusion system. This study was designed to evaluate the early phase of ischemia reperfusion injury therefore it was found that bax and bcl-2 levels, which are markers of apoptosis, did not differ between the two groups. Considering the biochemical parameters, CK, Myoglobin values, which are muscle breakdown products, LDH and lactate values, which show metabolic load, were found to be higher in the cold storage group than in the perfusion group. No difference was found between the skin findings after ischemia reperfusion between the two groups; however, after Cox staining and hematoxylin/eosin staining of the muscle samples, significant mitochondrial damages were observed only in the cold storage system- In conclusion, the extracorporeal circulation model caused less inflammatory and oxidative damages than the cold storage model in the early phases of ischemia reperfusion injury. Therefore, the use of extracorporeal circulation systems in the replantation or transplantation of extremities with large muscle mass may produce more successful results.

Key Words: Ischemia-Reperfusion injury, Oxidative stress, Extracorporeal circulation model, Cold storage method

İÇİNDEKİLER

TEŞEKKÜR.....	iii
ÖZET.....	iv
ABSTRACT.....	vi
İÇİNDEKİLER	viii
KISALTMALAR	xii
ŞEKİLLER.....	xiii
TABLolar.....	xvi
GRAFİKLER	xvii
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER.....	4
2.1. Kompozit Doku Naklinin Tarihçesi	4
2.2. Kompozit Doku Antijenitesi ve İskemi Zamanı	7
2.2.1. Derinin Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı	9
2.2.2. Kasın Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı	9
2.2.3. Tendonun Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı	9
2.2.4. Sinirlerin Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı	10
2.2.5. Damar Yapılarının Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı.....	10
2.2.6. Kemğin Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı	11
2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı	11
2.3.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Mekanizması	13
2.3.1.1. İskemik Hasar	13
2.3.1.2. Reperfüzyon Hasarı	14
2.3.1.3. IRH’de Mitokondrinin Rolü	15
2.3.1.4. IRH’de Tehlike Sinyallerinin Rolü	17
2.3.1.5. Endotel Hücrelerinin IRH’de Rolü	18
2.3.1.6. Kompleman Sisteminin IRH’de Rolü.....	19
2.3.2. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Sistemik Etkileri.....	20
2.4. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIYS).....	21
2.4.1. Doku Hasarı.....	23
2.4.2. Alarminler.....	23

2.4.3. Sitokin Dengesinin Bozulması	24
2.4.4. Endotelyal Aktivasyon	24
2.4.5. İmmün Hücre Birikimi	25
2.4.6. SIYS kliniği	25
2.5. İskemi/Reperfüzyon Hasarı İçin Tedavi Yöntemleri	26
2.5.1. Hücresel Yolaklar Üzerinden Geliştirilen Tedavi Modaliteleri	26
2.5.2. Diğer Yolaklar Üzerinden Geliştirilen Tedavi Modaliteleri	28
2.5.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisi	29
2.5.4. Kompozit Dokuyu Koruyucu Yöntemler	29
2.5.5. Extrakorporeal Perfüzyon Sistemi	31
2.6. Bu Çalışmada Bakılan Parametreler	31
2.6.1. Oksidatif Hasar İçin Bakılan Parametreler	32
2.6.1.1. TAS	32
2.6.1.2. TOS	32
2.6.1.3. SOD	33
2.6.1.4. Katalaz	33
2.6.1.5. Total Thiol	34
2.6.2. İnflamatuvar Şiddeti Ölçmek İçin Bakılan Parametreler	34
2.6.2.1. TNF- α	34
2.6.2.2. NF- κ B	35
2.6.2.3. IL-10	35
2.6.3. Apoptoz İçin Bakılan Parametreler	35
2.6.3.1. Bax Proteini	35
2.6.3.2. Bcl-2 Proteini	36
2.6.4. Biyokimyasal Belirteçler	36
2.6.4.1. Kreatin Kinaz (CK)	36
2.6.4.2. Myoglobin	37
2.6.4.3. Laktat	37
2.6.4.4. Laktat Dehidrojenaz (LDH)	37
2.6.4.5. Sodyum (Na) ve Potasyum (K)	37
3. GEREÇ VE YÖNTEMLER	39
3.1. Gruplama	40

3.2. Cerrahi İşlemler	40
3.2.1. Soğukta Saklama Grubu (Grup 1)	46
3.2.2. Ekstrakorporeal Dolaşım Grubu (Grup 2).....	48
3.2.2.1. Perfadeks Solüsyonu İle Perfüzyon	51
3.3. Doku Örnekleri ve Bakılacak Parametreler	54
3.3.1 Protein Homojenizasyonu	54
3.3.2. Oksidatif Stres Parametreleri.....	55
3.3.2.1. TAS/TOS Ölçümü	55
3.3.2.2. Katalaz, SOD ve Total Thiol Ölçümü	56
3.3.3. Histopatolojik Parametreler.....	56
3.3.3.1. bcl-2/bax Ölçümü.....	57
3.3.4. İnflamasyon belirteçleri.....	57
3.4. İstatiksel Değerlendirme	57
4. BULGULAR.....	59
4.1. Oksidatif Stres Parametreleri.....	59
4.1.1. TAS Ölçümü	59
4.1.2. TOS Ölçümü.....	61
4.1.3. OSI Değeri.....	63
4.1.4. Katalaz Ölçümü	65
4.1.5. SOD Ölçümü	65
4.1.6. Total Thiol Ölçümü	67
4.2. Apoptotik Parametreler	69
4.2.1. bcl-2/bax Ölçümü	69
4.3. Histopatolojik Parametreler	71
4.3.1. Cilt ve Sinire Ait Değişiklikler	71
4.3.2. Kas Dokusuna Ait Histopatolojik Değişiklikler	71
4.4. İnflamatuvar Değişiklikler.....	73
4.4.1. IL-10 Ölçümü	73
4.4.2. TNF- α Ölçümü	75
4.4.3. NF-K β Ölçümü.....	77
4.4.4. Biyokimyasal parametreler.....	79
5. TARTIŞMA	81

6. SONUÇ	92
7. KAYNAKLAR.....	93

KISALTMALAR

COX	: Sitokrom Oksidaz
ETS	: Elektron Taşıma Sistemi
HAFA	: Hayatta Kalmayı Arttırıcı Faktörlerin Artışı
HOT	: Hiperbarik Oksijen Tedavisi
HUF	: Hipoksi ile Uyarılan Faktör
IHAM	: İntraselüler Hücre Adezyon Molekülü
IRH	: İskemi/Reperfüzyon Hasarı
KDR	: Kompozit Doku Replantasyonu
KDT	: Kompozit Doku Transplantasyonu
LDH	: Laktat Dehidrogenaz
MDA	: Malonildialdehit
MMF	: Mikofenolat Mofetil
MMP	: Matriks Metalloproteinaz
MSK	: Membran Saldırı Kompleksi
NADPH	: Nikotin Adenin Dinükleotit Fostat
NO	: Nikrik Oksit
PİMP	: Patojen İlişkili Moleküler Patern
RHGK	: Reperfüzyon Hasarı Geri Döndürücü Kinaz
ROM	: Reaktif Oksijen Metabolitleri
SIYS	: Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu
SOD	: Süperoksid Dismutaz
TAS	: Total Antioksidan
TİMP	: Tehlike İlişkili Moleküler Patern /Alarminler
TLR	: “ <i>Toll-like receptor</i> ”
TAS	: Total Antioksidan
TOS	: Total Oksidan
VEBF	: Vasküler Endotelyal Büyüme Faktörü
VHAM	: Vasküler Hücre Adezyon Molekülü
vWF	: von Willebrand Faktör

ŞEKİLLER

- Şekil 1.** Cosmas ve Damian'ın yaşlı bir hastaya siyahi bir ölünün bacağını mucize olarak naklettiğini gösteren tasvir.(10)..... 5
- Şekil 2.** Suprakondiler seviyeden el nakli, cerrahi bitimi görüntüsü 6
- Şekil 3.** IRH hasarı öncelikle hücresel boyutta başlar. Hipoksik ortamda metabolik stres artar ve bu bazı oksidatif hasar mekanizmalarını uyarır. Hücre içi bazı dengeler bozulduğundan apoptoz tetiklenir. Vasküler geçirgenliğin artışına bağlı olarak immün hücrelerde adezyon başlar. Donörden alınan kompozit dokuda benzer sorunlar ortaya çıkar. Nakil sonrasında alıcıda bu durum immün sistemin aşırı uyarılmasına ve IRH'nin oluşmasına yol açar. 12
- Şekil 4.** Lipit peroksidasyonunda yaşanan bozukluklar sonrasında bu lipitler demir ile şelasyon yaparak apoptozu indükler. Buna ferroptozis denir. 14
- Şekil 5.** İskemi ile hücrede enerji ihtiyacı artar. Hücresel homeostaz bozulur, ROM'ların ve kalsiyumun miktarı artar. Bu durum reperfüzyon sırasında endotelial aktivasyon ve proteazların aktivasyonuna yol açar. Endotelial hasar ve dokudaki hasarın temelinde bu yatar. Oluşan hasar apoptoz veya nekroza dönüşebilir. 16
- Şekil 6.** Uyarının gelmesiyle beraber G protein aracılı reseptör uyarılır. Daha sonra membranda bulunan diğer fosfolipaz C'yi uyarır ve bunun sonucunda fosfotidil inozitol-3- fosfat oluşur. Bu molekülün endoplazmik retikulumunda kalsiyum reseptörlerine bağlanmasıyla kalsiyum sitoplazmaya çıkar. Daha sonra bir dizi yolak kullanarak protein kinazları aktive eder. İskemi durumunda ortaya çıkan inflamatuvar süreçlerde ve iskemi bağımlı hücre değişikliklerinde bu mekanizma önemli rol oynar. 18
- Şekil 7.** Kompleman sistemi 3 ayrı yoldan aktive olabilir. Sonuçta hepsi C3 ve C5'i aktive ederek membran saldırı kompleksini aktive eder. Bu hücre yıkımını aktifleştirir. 19

Şekil 8.	Vasküler yapı içerisinde bulunan inflamatuvar hücreler, alarminler gibi pek çok molekül hücreler arası ortamda farklı inflamatuvar yanıtlar oluşturur. Bu hücreyi etkiler.	22
Şekil 9.	Hasar sonrasında endotel, platelet ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ile sistemik inflamatuvar yanıt başlar.	24
Şekil 10.	RHGK yolağı G protein üzerinden çalışır. Hormonların büyük kısmı bu yolağı aktive eder. İskemik ön koşullama ve hafif düzeyde iskemik hasar bu yolak üzerinden hücre apoptozunu azaltır ve hücrede antioksidan mekanizmaları uyarır. HAFA yolağı TNF, sitokinler, interlökinler ile uyarılır ve yine apoptozu engeller.	27
Şekil 11.	Deney hayvanlarının gözü pomad yardımıyla korundu.	41
Şekil 12.	Tıraş edilen sıçan arka bacağı	42
Şekil 13.	Rektal prob yardımıyla sıcaklık kontrolü	43
Şekil 14.	Termoregülasyonu sağlamak amacıyla sıcak ısı kaynağı ile ısıtılan sıçan. Rektal probun bağlı olduğu termometre ile sıcaklık kontrol edilebilir.	44
Şekil 15.	Unipolar lup uçlu koter.	44
Şekil 16.	Femoral arter ve venin olduğu nörovasküler paket	45
Şekil 17.	Femoral arter ve ven ayrı ayrı serbestleniyor.	45
Şekil 18.	Amputasyon modeli yapılan sıçan arka bacağı 2 adet buzlu su dolu eldiven arasında soğuğa fiziksel temas etmeden 6 saat iskemik bekletildi. Deney hayvanı üzerindeki cilt ile kaplı olmayan cerrahi alanlar nemli spanç yardımıyla kapatılarak ısı ve sıvı kaybı azaltılmaya çalışıldı.	47
Şekil 19.	Arterin proksimalindeki klemp ve distalinden kanülasyonu görülmektedir.	49
Şekil 20.	Arter ardından ven kanülasyonu sağlanır.	49
Şekil 21.	Kanül sabitleyici yardımıyla tutularak herhangi bir mobilizasyona karşılık önlem alındı.	50
Şekil 22.	Deney sonunda ampute edilen bacakta gastrokinemius kası izole ediliyor.	51

- Şekil 23.** Perfüzyon pompası saatte 5 ml'ye kadar düşük miktarda sıvı verebileceği gibi saatte 240 ml'ye kadar çıkabilir. 52
- Şekil 24.** Aynı anda 2 deney hayvanı için kurulmuş olan cerrahi düzenek. Her hayvan için ayrı bir perfüzyon pompası kullanılarak 2 hayvan için perfüzyon sıvı miktarları arasında dengesizlik oluşturulmaması sağlanmıştır. 53
- Şekil 25.** Deney hayvanları perfüzyon sisteminde subnormotermik koşullarda perfüze oldu. 54
- Şekil 26.** Cilt ve cilt altı dokuda soğukta saklama grubu ve perfüzyon grubunun histopatolojik olarak 20x büyütmede görüntüsü 71

TABLolar

Tablo 1. Ampute olmuş ekstremiteilerin rekonstrüksiyonu sırasında yöntemler, cerrahilerin farkları ve sonuçların kıyaslanması.....	7
Tablo 2. Kompozit doku içerisinde bulunan yapıların iskemi zamanları	8
Tablo 3. Hücresel elemanların geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz histopatolojik bulguları.....	13
Tablo 4. Dokuda konjesyon, fibrozis, rejenere lif ve cox eksikliği hiçbir örnekte görülmedi. Diğer örneklerde görülen değişimlerin kaç örnekte ve hangi skorda görüldüğü tabloda gösterilmiştir.	72

GRAFİKLER

Grafik 1.	Kas homojenatlarında TAS ölçümü.....	60
Grafik 2.	Kan örneklerinde TAS ölçümü	61
Grafik 3.	Kas homojenatlarında TOS ölçümü	62
Grafik 4.	Kan örneklerinde TOS ölçümü.....	63
Grafik 5.	Kas homojenatında OSI değeri.....	64
Grafik 6.	Kan örneklerinde OSI ölçümü.....	64
Grafik 7.	Kas homojenatlarında katalaz ölçümü.....	65
Grafik 8.	Kas homojenatlarında SOD ölçümü.....	66
Grafik 9.	Kan örneklerinde SOD ölçümü	67
Grafik 10.	Kas homojenatlarında total tiol ölçümü	68
Grafik 11.	Kan örneklerinde total tiol ölçümü.....	69
Grafik 12.	Kas homojenatlarında bcl-2 ölçümü.....	70
Grafik 13.	Kas homojenatlarında bax ölçümü	70
Grafik 14.	Kas homojenatlarında IL-10 ölçümü.....	74
Grafik 15.	Kan örneklerinde IL-10 ölçümü	75
Grafik 16.	Kas homojenatlarında TNF- α ölçümü.....	76
Grafik 17.	Kan örneklerinde TNF- α ölçümü	77
Grafik 18.	Kas homojenatlarında NF- κ B ölçümü	78
Grafik 19.	Kan örneklerinde NF- κ B ölçümü.....	79
Grafik 20.	Perfüzyon sistemi ile korunan amputasyon modelinde biyokimyasal parametreler	79
Grafik 21.	Soğukta saklama yöntemi ile korunan amputasyon modelinde biyokimyasal parametreler	80

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Günümüzde başta iş kazaları olmak üzere, trafik kazaları, deprem gibi toplumsal felaketler ve ev yaralanmaları sonrasında mikrocerrahi gerektiren amputasyonlara sıklıkla karşılaşılmaktadır. Ampute olan bireylerin yaşam kalitesi önemli ölçüde azalmakta hatta bazı durumlarda kendi temel ihtiyaçlarını karşılayamamaktadırlar. Özellikle toplumumuzu etkileyen güncel deprem olayında çok sayıda birey ekstremitte kaybı yaşamıştır. Bu bireylerde bir iş gücü kaybı oluşmakta ve bu durum topluma ekonomik bir yük getirmektedir. Bu sebeple replantasyon ve transplantasyonlar birçok açıdan bireyin yaşam kalitesi ve toplumda yer edinebilmesi açısından oldukça önemlidir.

Ekstremitte nakilleri ve ekstremitte amputasyonlarının replantasyonu sırasında klasik kompozit doku saklama ve transport yöntemi soğukta saklamadır. Soğukta saklama yöntemi ucuz, ulaşılabilir, basit, öğrenilebilir ve uygulanabilir bir yöntemdir. Ancak soğukta saklama yönteminin metabolik ihtiyacı fazla olan dokuların ve büyük kas kitlesi olan ekstremitelerin taşınmasında yeterli bir süre sağladığı düşünülse de uzamış soğukta saklama süresi, dokularda iskemi-reperfüzyon hasarını engelleyememekte ve bu durumda replante veya transplante edilen ekstremitenin fonksiyonunda ve sağkalımında başarısız sonuçlar oluşabilmektedir. Ayrıca çoklu ekstremitte amputasyonlarında cerrahi süresi uzadığından soğukta saklama yöntemi ile iskemi süresi uzamakta ve başarılı sonuçlar elde etmek zorlaşmaktadır. Buna alternatif olarak kullanılacak ex-situ perfüzyon yöntemlerinin daha az iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturduğu bilinmekte ve bu sebeple daha az sistemik inflamatuvar yanıt oluşturacağı varsayılmaktadır.

Vaskülerize kompozit dokuların ex-situ perfüzyon sistemlerinde saklanması halinde iskemik doku hasarının azaldığı daha önceki çalışmalarda gösterilmiştir.(1)(2) Bu sistemler dokuya hem yeterli oksijeni sağlamak hem dokunun sıcaklığını istenilen düzeyde tutmakta hem de oluşan metabolik yan ürünlerin atılmasını sağlamaktadır. Literatürdeki majör ekstremitte replantasyonu ve transplantasyonu sonuçlarının parmak amputasyonlarından daha başarısız sonuçları olmasının temel sebebi kas kitlesinin daha fazla olması nedeniyle oluşan iskemi-reperfüzyon hasarının

daha fazla sistemik inflamatuvar yanıt oluşmasıdır. Oluşan bu inflamatuvar yanıt sonrasında nakledilen ekstremitelere kaybedilebilmekte hatta hasta ölümleri görülebilmektedir.(3)

Solid organ nakillerinde ekstrakorporeal dolaşım sistemleri kullanılarak iskemi-reperfüzyon hasarının azaltıldığı gösterilmiş ve bu sistemler solid organ nakillerinde klinik kullanıma girmeye başlamıştır.(4) Soğukta saklama yöntemleri ile karaciğer gibi solid organların 12-18 saatlere kadar saklanabildiği görülmüş olsa da transplantasyon cerrahisinde fonksiyonel kazanımların daha yüksek olması için bu sürenin oldukça altında kalınması amaçlanmaktadır. (5) Bu süre ekstrakorporeal dolaşım sistemleri kullanılarak 24 saati aşmaktadır hatta deneysel çalışmalarda 7 güne kadar solid organların fonksiyonunun ve histolojisinin korunduğu gözlenmiştir. (6) Solid organların aksine kas kütlesi ve metabolizması daha fazla olan ekstremitelerde ekstrakorporeal dolaşım sistemleri yeterli deneysel ve klinik çalışma olmadığından halen rutin kullanıma girememiş ve bu amaçla kullanılacak bir makine perfüzyon sistemi üretilmemiştir.

Replantasyon/transplantasyon cerrahisindeki sorunlara alternatif bir çözüm oluşturabilmek için bu çalışmada perfüzyon ile ekstremitelerin canlılığını koruma yöntemini, soğukta saklama yöntemiyle karşılaştırarak değerlendirme yaptık. Çalışmamızda, laboratuvara uyum sürecini tamamlayan erişkin erkek Wistar-Albino sıçanlar kullanıldı. Anestezi altında sol arka ekstremitede inguinal ligamente paralel bir şekilde oblik insizyon yapıldıktan sonra tüm hayvanlarda femoral arter ve ven disseke edilip çevre dokulardan ayrıldı. Rastgele iki gruba ayrılan hayvanlardan 1. Gruba (Soğukta saklama) alınan hayvanların femoral arter ve venleri klemlenerek dolaşım durdurdu ve femoral damarlar haricinde tüm dokuları içeren transfemoral amputasyon yapıldı. Klempin distalinde kalan amputat su geçirmez bir kılıfla sarılarak 6 saat buzlu su içerisinde suya temas etmeden bekletildi. Bu sırada deney hayvanının kalan vücut yapısı ısı yalıtımlı bir köpük ile buzlu su ortamından ayrıldı ve ısıtıldı. 2. Gruptaki (Perfüzyon sistemi) hayvanlarda diseksiyondan sonra arter ve ven kanüle edildi. Femoral damarlar haricinde tüm dokuları içeren transfemoral amputasyon yapıldı ve arter klemlenerek sistemik dolaşım kesildi. Böylece iskemi oluşturuldu. Klempin distalinden bir kanülle femoral arter perfüzyon sistemine bağlandı. Femoral

ven yine kanüle edilerek sistemde dolaşan sıvının geri toplanması sağlandı. Amputat osmotik basıncı korumaya yönelik olarak perfedeks solüsyonu (İçeriğinde, her 1000 ml'de; Dextran 40 (Mw 40000), 6 mmol K⁺, 0,8 mmol Mg⁺², 0,8 mmol H₂PO₄ ve H₂PO₄⁻², 5 mmol Glikoz bulunur) ile nihai solüsyon basıncı 2 ml/dk olacak şekilde kademeli olarak arttırılarak bu değerde 6 saat perfüzyon sağlandı. (7) Bu sırada deney hayvanının vücut sıcaklığı korundu. Perfüzyon sıvısı ise oda sıcaklığında subnormotermik değerlerde (15-28 °C) tutuldu.

Her iki grupta da 6 saatin sonunda amputatı üzerindeki klempler açılarak reperfüzyon sağlandı. Bir saatlik reperfüzyon süresi tamamlandıktan sonra hayvanlar anestezi altındayken kan alınarak hayvan hiç uyandırılmadan kurban edildi. Reperfüzyonun ardından alınan gastrokinemius doku örneklerinden, cerrahi öncesi alınan kandan ve reperfüzyon sonrası alınan kandan elde edilen serum örneklerinden oksidatif hasar, inflamatuvar hasar, biyokimyasal parametreler ve apoptoz düzeyi incelendi. Mitokondriyal sitokrom oksidaz (COX) boyaması yapılarak mitokondriyal hasar ve rutin hematoksilen/eozin boyaması ile kas lifi hasarı histopatolojik olarak değerlendirildi. Ekstremiteden alınan deri örneklerinden iskeminin cilt bulguları değerlendirildi. Çalışma sonunda ex-situ perfüzyon sisteminde saklanan amputatlarda inflamasyon cevabının ve doku hasarının soğukta saklama grubuna göre farklılıkları ortaya konuldu.

2. GENEL BİLGİLER

Kompozit doku, birden fazla farklı histolojik doku tipini barındıran ancak tek bir cerrahi ünite olarak bulunan yapılardır. Bunun en basit örnekleri arasında el, kol ve bacak sıralanabilir. Bu yapılar, içerisinde deri, derialtı dokular, kas, sinir, tendonlar, damarlar ve kemiklerin bulunduğu ünitelerdir. Geçmişten günümüze yaralanmalar, cerrahiye bağlı rezeksiyonlar veya doğumsal eksiklikler sonrasında kompozit dokuların replantasyonu veya transplantasyonu her zaman önem arz eden ve merak uyandıran bir konu olmuştur. Mikrocerrahinin gelişmesiyle beraber bu dokuların vaskülerize bir şekilde taşınması mümkün olmaya başlamıştır. Amerika Birleşik Devletleri'nde (ABD) ortalama her yıl 7 milyon insan kaza, doğumsal anomali veya kanser cerrahisine bağlı kompozit doku transferi ihtiyacı duymaktadır. (8) Bu bireylerde yaşamı tehdit eden bir durum oluşursa da bu bireyler sosyolojik olarak toplumdan izole olmakla beraber fonksiyonel olarak da üretime katkıda bulunamamakta hatta bazen kendi temel ihtiyaçlarını bile karşılayamamaktadır. Bunun sonucunda hem toplumlara hem de devletlere büyük bir ekonomik yük binmektedir. Bütün bunlar göz önüne alındığında kompozit doku transplantasyonu (KDT) ve kompozit doku replantasyonu (KDR) kişinin hem fonksiyonel hem de estetik olarak kabul edilebilirliğini ve hayat kalitesini arttıran kaçınılmaz bir cerrahi yöntem olarak kabul edilmektedir.

2.1. Kompozit Doku Naklinin Tarihçesi

Antik çağlardan günümüze kadar KDT her zaman merak uyandırmıştır. Günümüzde plastik cerrahide de kullanılan kimerizm kavramının isim babası olan Yunan mitolojisi karakteri "Chimera" kompozit dokuların ksenotransplantasyonu düşünülerek üretilmiş bir karakterdir. Çin mitolojisinde Doktor Bian Que'nin yaptığı iki kalp transplantasyonu ve sonraki tedavi süreci KDT'nin uzak doğu uyarlıklarında da ilgi çektiğinin kanıtıdır. 348 yılında Aziz Cosmos ve Damian, Etiyopyalı bir ölünün bacağına hastalıklı yaşlı bir adamın bacağına naklettiği mitolojisi gibi birçok mit transplantasyonun geçmişte de merak uyandırdığını ve önemini vurgular (Şekil 1). (9)



Şekil 1. Cosmas ve Damian'ın yaşlı bir hastaya siyahi bir ölünün bacağına mucize olarak naklettiğini gösteren tasvir.(10)

Solid organ transplantasyonları daha erken dönemlerde denense de kompozit doku transplantasyonu (KDT) ilk olarak 1964 yılında Dr. Robert Gillies tarafından Ekvador'da el nakli denemesi ile başlamıştır. O yıllarda immüsupretif olarak sadece hidrokortizon ve azatioprin kullanılmış ancak yeterli ve toksik olmayan dozları ile ilgili yeteri kadar bilgi edinilememiştir. Kadavradan nakledilen bu el yaklaşık 2 haftalık bir süre sonrasında doku rejeksiyonuna bağlı olarak kaybedilmiştir. (11)Bu deneyimden sonra transplantasyon immünolojisi kavramı ortaya çıkmış ve immüsupresyon tedavilerinin kompozit doku transplantasyonlarında önemi artmıştır. Siklosporinin keşfi ve solid organ transplantasyonlarında kullanımından sonra 1985 yılında sıçan arka bacağı transplantasyon modelindeki başarılı sonuçları gösterilmiştir. (12) 1993 yılında mikofenolat mofetil (MMF) kullanımının da sıçan arka bacağı transplantasyonundaki üstün başarısı gösterilmiştir. (13) Ardından çok sayıda

immünsüpresif ajanın farklı kombinasyonlarda deneysel olarak transplantasyonda başarılarını gösteren çalışmalar yapılmıştır. (14) (15)

Daha sonra 1998 yılında Dr. Jean-Michel Dubernard tarafından Fransa’da başarılı ilk el transplantasyonu yapılmış ve 2001 yılına kadar bu dokunun yaşamsallığı ile ilgili sorun olmamıştır (Şekil 2). Hastanın ilaç kullanımında düzensizliğinden ötürü 3 yıl sonra bu dokunun da rejeksiyonu görülmüştür. (16) Bunun ardından Fransa, Çin, ABD’de benzer yıllarda el transplantasyonları yapılmıştır. 2000 yılında 18 cerrahın katıldığı dünyanın ilk bilateral kol nakli Fransa’da yapılmıştır. (17) 2006 yılında Kanada’da ilk başarılı alt ekstremite nakli “*ischiopagus*” doğan kardeşlerin ölen ikizinden yaşayan kardeşine yapılan nakildir. Ayrıca bu nakil ikizler arasında olduğu için immünsupresyon gerektirmemiştir ve dünyada yapılan ilk ikizden ikize nakildir. (18) 2011 yılında Cadavas tarafından kadavradan bilateral transfemoral alt ekstremite nakli yapılmış olsa da hastada lenfoproliferatif hastalık gelişmiş ardından ekstremite alınmış ve hasta ölmüştür.



Şekil 2. Suprakondiler seviyeden el nakli, cerrahi bitimi görüntüsü

Günümüze kadar yaşayan 100’den fazla ekstremite, 40’tan fazla yüz ve genito-üriner sistem nakilleri yapılmıştır. (19) Günümüze kadar yapılan tekli üst ekstremite nakillerinde başarı oranları %90’ların üzerine çıkmışken kompozit dokuların kombine nakillerinde bu oranlar düşmektedir. Dünyada ilk defa denenen dört ekstremite nakli bunun örneklerindedir. Çok sayıda ekip beraber çalışmış olsa da iskemi ve buna bağlı reperfüzyon problemleri geri dönüşümsüz aşamaya girerek gelişen sistemik

inflamatuvar yanıt sendromu hasta kaybına yol açmıştır. (3) Bu sebepten ötürü başarıyı arttırıcı stratejilerin keşfi ve kullanılması elzem hale gelmiştir.

2.2. Kompozit Doku Antijenitesi ve İskemi Zamanı

Ekstremitte rekonstrüksiyonunda otolog flepler, replantasyon ve transplantasyon kullanılabilir yöntemlerdir (Tablo 1). Replantasyon seçeneği olmayan durumlarda fonksiyonel ve estetik olarak en iyi sonucu verecek olan yöntem kompozit doku transplantasyonudur. Transplantasyonda nakledilen doku deri, derialtı doku, kas, sinir, damarlar, tendonlar, kemik gibi dokular içermektedir. Bu dokuların hepsinin farklı antijenik özellikleri mevcuttur. Bu dokular içerisinde en antijenik yapı deri olarak sayılabilir. Derinin özellikle Langerhans antijen sunucu hücreleri bunun temel sebebidir.

Tablo 1. Ampute olmuş ekstremitelerin rekonstrüksiyonu sırasında yöntemler, cerrahilerin farkları ve sonuçların kıyaslanması

Ampute Uzuvlarda Replantasyonun ve Transplantasyonun Kıyaslaması		
Replantasyon	Oto-rekonstrüksiyon (Serbest, rejyonel flepler)	Allo-rekonstrüksiyon (Transplantasyon)
Temel özellikler		
Acil durumlarda Travmatik amputasyonda yapılır Sıcak iskemi zamanı önemli Amputasyon seviyesinden yapılır	Planlı cerrahi Her durumda yapılabilir Sıcak iskemi zamanı önemli Her seviyeden rekonstrükte edilebilir	Planlı cerrahi Her durumda yapılabilir Soğuk iskemi zamanı önemli Her seviyeden rekonstrükte edilebilir
Cerrahi Yöntem		
Replantasyon Donör morbidite yok Ortotropik transfer	Doku alım ve yerleştirme Donör morbidite var Heterotropik transfer	Transplantasyon Donör morbidite yok Ortotropik transfer
Sonuçlar		
Hemen görülür Nörotizedir Doğal estetik görünüm	Zamanla görülür Fonksiyon zayıftır Yetersiz estetik görünüm	Zamanla görülür Nörotizedir Doğal estetik görünüm

İmmün sistemin doku nakillerinde önemi ilk olarak allojenik deri grefti cerrahilerinde gündeme gelmiştir. Nakledilen grefte karşı verilen yanıtın zamanla hem hücrel bağışıklık hem humoral bağışıklık hem de kompleman bağımlı yollardan olduğu keşfedilmiştir. Bu sebeple günümüzde transplantasyon immünolojisinde hedefe yönelik immünsupresyon büyük önem taşımaktadır. (20)

İlk el transplantasyonunda kullanılan steroid ve azatiyoprin daha önceki solid organ nakillerinde başarılı sonuçlar verse de kompozit doku transplantasyonunda yeteri kadar başarı sağlamamıştır. Bunun sebebi kompozit dokunun farklı embriyonik tabakalardan oluşması ve buna bağlı olarak antijenik özelliklerinin farklı ve yoğun olması olabilir. Kompozit dokulardaki antijeniteye bakıldığında en fazladan aza doğru deri, kas, kemik, kıkırdak, sinirler ve damarlar olarak sıralanabilir. Çok farklı sayıda antijenik özelliğin tek bir kompozit dokuda olması sebebiyle farklı tipte rejeksiyonlar aynı anda görülebilmektedir. (21) Nakledilen kompozit dokudaki herhangi bir yapıya karşı gelişmiş rejeksiyon tüm nakledilen yapının kaybına sebep olabilmektedir.

Kompozit doku nakillerinde iskemi zamanını belirlemek için yeterli çalışma yoktur. Kompozit doku içeriğine bakıldığında kas dokusunun iskemiye en hassas yapı olduğu göz önüne alındığında bu dokuların iskemi zamanı için kas yapılarının temel alınması uygundur. Kompozit dokuların sıcak iskemi zamanının 4 saat ve soğuk iskemi zamanının 12 saat olduğu kabul edilse de bu sürelerin üzerinde başarılı replantasyon ve transplantasyonlar bildirilmiştir. (22) Kompozit doku içeriklerinin iskemi zamanı tabloda özetlenmiştir (Tablo 2).

Tablo 2. Kompozit doku içerisinde bulunan yapıların iskemi zamanları

Doku	Sıcak iskemi zamanı	Soğuk iskemi zamanı
Deri	4-6 saat	12 saat
Kas	<3 saat	8 saat
Sinir	8 saat	24 saat
Damar	6 saat	12 saat
Kemik	<4 saat	24 saat

2.2.1. Derinin Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı

Deri vücudumuzdaki en geniş organdır. Vücudu dış etkilere karşı koruyan bir bariyer iken ısı regülasyonu, immünolojik koruma gibi daha pek çok görevleri vardır. Bununla birlikte dış dünyadaki patojenlere karşı korunmak için çok güçlü bir antijenik yapısı vardır. Bu sebeple kompozit doku nakilleri sonrasında nakledilen dokuda özellikle deriye karşı antijenik reaksiyon çok güçlü olabilir ve dokunun kaybına da bu yol açabilir. Kompozit doku rejeksiyonu takibi için donör doku deri biyopsileri ile takip edilir.

Deri ve deri altı dokunun iskemiye karşı direnci fazladır ve hücre içi pH değişiklikleri soğukta saklama boyunca 12 saate kadar geri dönüşümlüdür. (23) Deneysel tavşan flep modellerinde derinin normotermik koşullarda iskemi zamanının 4-6 saat olduğu ve soğuk saklama yöntemiyle 48 saate kadar ulaşabildiği gösterilmiştir. (24)

2.2.2. Kasın Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı

Kas mezodermal orjinlidir ve deriye göre antijenik etkisi zayıftır. Yine de miyositler hem tüm hücrelerde olan antijenleri hem de miyosit spesifik antijenleri sentezler. KDT sırasında oluşan inflamasyon ve iskemi-reperfüzyon hasarı ile "*sarkolemmal class I antijen*" sentezi ve MHC sentezi artar. (25) Bu durum yavaş ve zayıf bir doku rejeksiyonunu başlatır. Daha sonra mononükleer hücre infiltrasyonu başlar ve bu hücreler miyositlere zarar verir. Ardından nekroz başlar.

Kas iskemiye deriye göre daha duyarlıdır. Sıçan deney modelinde soğuk iskemi süresi 16 saate kadar ulaşabilir. (26) İnsan kas iskemi süresine bakıldığında geri dönüşümsüz aşamanın soğukta saklamada bile 6-8 saat sonra başladığı görülmüştür. Ancak bu konuda yeterli çalışma mevcut değildir. (27)

2.2.3. Tendonun Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı

Tendonlar kaslara göre daha zayıf antijenik özelliğe sahiptir. Hatta bazı çalışmalar tendonların otogreft veya allogreft olarak kullanımları arasında immünolojik olarak bir fark olmadığını savunmaktadır. (28) Bunlara dayanarak vaskülerize fleksör tendon allogreft transplantasyonları yapılmış olup sonuçları

oldukça yüz güldürücüdür. (29) Tendonların iskemi zamanı için yeterli çalışma olmamakla beraber soğukta saklanıldığı sürece iskemi hasarının olmayacağı kabul edilir. (22)

2.2.4. Sinirlerin Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı

Mackinnon ve arkadaşları tarafından sinir allogreft transferleri tanımlanmıştır. (30) Sinir transferi sonrasında düşük doz immünsupresyon dahi yeterli olabilmektedir. Sinir üzerinde miyelin kılıfları sentezleyen Schwann hücreleri hem adezyon molekülleri hem de antijenik proteinleri sentezleyen sinirin antijenik yapısının temelini oluşturan komponenttir. Sinir transferi sonrasında en başta bu hücelere karşı reaksiyon gelişse de sinir rejenerasyonu sırasında alıcının sinirlerinden gelişim olduğu için izole sinir allotransplantasyonlarında immünsupresyonun da ömür boyu kullanılmasına gerek yoktur. (31) Sinirde oluşan inflamasyon perinöral alanda sınırlı olacak şekilde oluşur. Bu sebeple kompozit doku nakillerinde sinir antijenitesi nakledilen uzvun hayatını tehlikeye atacak kadar olmamaktadır. Deneysel modellerde sinirler 3 güne kadar soğuk iskemiye dirençlidir. (32)

Sinir dokusunun normotermik koşullarda saklanmasıyla 8 saate kadar iskemiye dayanıklı olduğu deneysel çalışmalarda gösterilmiştir. Bu süre soğukta saklama yöntemleri kullanıldığında 24 saate kadar ulaşabilmektedir. (33)

2.2.5. Damar Yapılarının Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı

Damarlar KDT sırasında en önemli yapı taşlarıdır. Nakledilen dokunun yaşaması için öncelikle bir arterin dolaşım sağlaması ve bir venin bu gelen kanı boşaltması gerekir. Damar yapılarının endoteli transplantasyon sonrasında alıcının ilk karşılaştığı yabancı dokudur. Bu hücreler alıcının sitotoksik T hücrelerini ve antijen sunucu hücrelerini aktive eder. Aynı zamanda bu endotelyal hücreler çeşitli agregan ve proinflamatuvar sitokinler sentezleyerek bir sitokin fırtınasına yol açabilir. (34) Bunun sonucunda eğer alıcıda daha önceden vericiye karşı antikorlar varsa hiperakut reaksiyon dahi gelişebilir.

Endotel hücrelerinin KDT sonrası ilk antijenik etkisi yüksek doz induksiyon immünsupresyon ile çözülür. Zamanla yeni oluşan endotelyal hücreler alıcı kaynaklı

progenitor hücrelerden köken aldığından immünolojik reaksiyonlar oldukça azalır. Kronik dönemde damar düz kaslarında inflamasyon, intimada fibrozis ve bunlara bağlı damar lümeninde darlık gelişebilir. Bu durum kronik rejeksiyonda allotransplantın kaybına yol açabilir.

Vasküler yapıların iskemi zamanı özellikle miyokardiyal anoksi durumlarında oldukça önemlidir. Bu konuda yapılan çalışmalara bakıldığında vasküler dokuların normotermik koşullarda saklanmasıyla hücre içi geri dönüşümsüz hasar aşamalarının 6 saatte başladığı gösterilmiştir. (35) Soğukta saklama yöntemleri sonrasında vasküler yapılar taşındığında bu süre 12 saate kadar ulaşabilmektedir. (36)

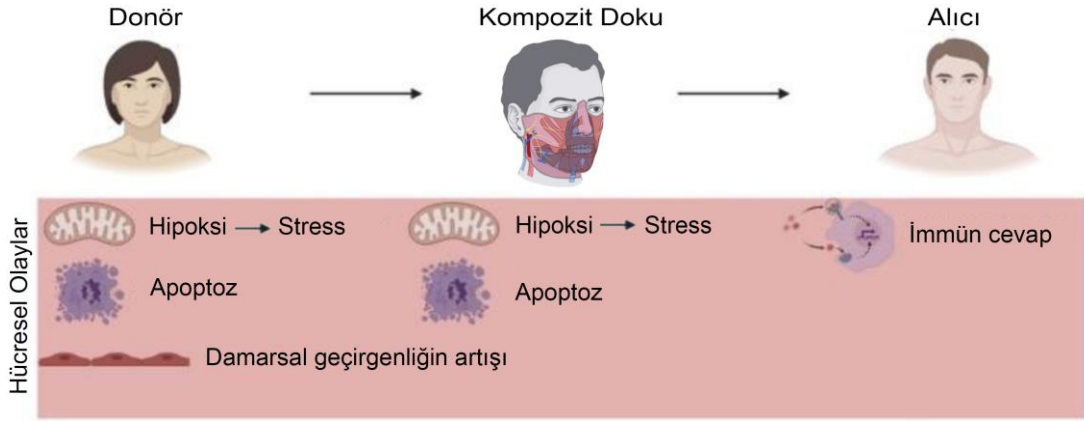
2.2.6. Kemik Antijenik Özellikleri ve İskemi Zamanı

Kemik yapılarda antijenik özellikler oldukça zayıftır. Osteokondral yapıların yüzeylerindeki proteinlere karşı immünolojik reaksiyon gelişebilir. Bu yapıları çok düşük derecelerde dondurmak antijenik özelliklerini azaltabilir. (37) İzole kemik allogreftlerinin antijenitesinde alıcı ve vericinin MHC uyumu önemli rol oynar. MHC uyumu arttıkça allogreft reddi azalır. KDT sonrasında oluşan doku rejeksiyonlarında kemik oldukça az rol oynar.

Kemik yapıların 37 °C’de saklanması ardından nakledildiğinde kemikte büyüme ve gelişmenin 7 saate kadar iskemik kemiklerde devam ettiği gösterilmiştir. Soğuk iskemi ile saklandığında bu süre 25 saate kadar ulaşabilmektedir. (38)

2.3. İskemi-Reperfüzyon Hasarı

Transplantasyon cerrahisinin popülaritesi ve ihtiyacı gün geçtikçe artmaktadır. Transplantasyon ihtiyacının artması ile paralel olarak donör organ ihtiyacı giderek artmıştır. Organ bağıışı programlarının yeteri kadar gelişmemiş olması sebebiyle alınan organların ve kompozit dokuların iskemi maruziyeti artar. İskeminin artışı ile beraber cerrahi sonrasında reperfüzyona bağlı hasar da artar. Bu sebeple KDT başarısı azalır. (39) Kompozit dokunun nakli sonrasında erken ve geç dönem fonksiyon kaybında, rejeksiyon ihtimalinin artmasında ve kronik rejeksiyonun daha belirgin olmasında da iskemi reperfüzyon hasarının (IRH) yeri vardır (Şekil 3).



Şekil 3. IRH hasarı öncelikle hücresel boyutta başlar. Hipoksik ortamda metabolik stres artar ve bu bazı oksidatif hasar mekanizmalarını uyarır. Hücre içi bazı dengeler bozulduğundan apoptoz tetiklenir. Vasküler geçirgenliğin artışına bağlı olarak immün hücrelerde adezyon başlar. Donörden alınan kompozit dokuda benzer sorunlar ortaya çıkar. Nakil sonrasında alıcıda bu durum immün sistemin aşırı uyarılmasına ve IRH'nin oluşmasına yol açar.

Herhangi bir travma veya cerrahiye bağlı olarak bir yapının vasküler yapılarında oluşan bozulmayla beraber yeterli oksijen ve besin alımı olamadığında bu duruma iskemi denir. İskemi sırasında oluşacak olan metabolitler ve radikaller daha sonra reperfüzyon ile beraber sisteme yansır. Bu durum bir metabolik stres yapar ve yol açtığı fonksiyonel ve yapısal değişikliklere iskemi/reperfüzyon hasarı (IRH) denir. IRH hasarında hücresel olarak, iskemi sırasında hasar görmüş hücrelerin kalıcı olarak nekrozu, hücresel düzeyde ödem ve buna bağlı fonksiyonel kayıplar, mitokondriyal hasar, endotelial harabiyet ve dengeli kan akışının sağlanamaması gibi durumlar gündeme gelir. (40)

Dokuda iskemi süresi arttıkça biriken metabolitin artmasından ötürü IRH artar. Transplantasyon esnasında donörün ve alıcının sistemik durumundaki problemler, cerrahi sırasındaki doku anoksisi, kompozit dokunun nakle hazır hale getirilmesindeki geçen süreç gibi faktörler IRH'yi arttırıcı etki yapar. Bu süreçler minimuma inse dahi moleküler düzeyde oluşacak iskeminin oluşturduğu az da olsa bir IRH mutlaka görülecektir. Oluşan bu IRH ve buna bağlı gelişen sistemik inflamatuvar yanıt sendromu (SIYS) nakil edilen yapının viabilitesini etkilemekte, alıcının morbitidesini belirlemekte ve hatta mortaliteye dahi yol açabilmektedir. (3)

2.3.1. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Mekanizması

İRH'nin hem lokal hem de sistemik etkileri vardır. İlk olarak oluşan iskemiye bağlı kan akışı yavaşlar veya durur ve buna bağlı olarak hücresel boyutta lokal olarak hücresel enerji kaybı yaşanır. Ardından reperfüzyon olduğunda iskemi sırasında oluşan reaktif oksijen metabolitlerinin (ROM) ve inflamatuvar belirteçlerin dolaşıma katılmasıyla sistemik etkiler başlar. Trombosit agregasyonu, nötrofil aktivasyonu, kompleman sisteminin aktivasyonu gibi sistemik durumlar SIYS oluşumunu dahi tetikleyebilir. (41)

2.3.1.1. İskemik Hasar

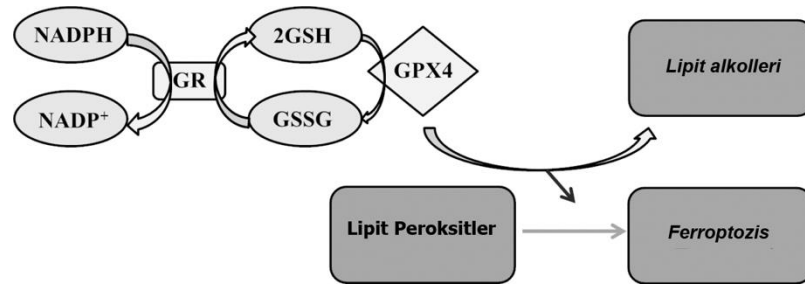
İskemiye bağlı kan akımının azalmasının oluşturduğu hipoksik ortam hücrelere farklı oranlarda zarar verir. Hücrenin hipoksiye verdiği yanıt metabolizmasının hızıyla orantılı olmakla beraber iskemi süresinin artmasıyla beraber her hücrede iskemik hasar artar. İlk başlarda oluşan değişiklikler geri dönüşümlü olsa da iskemi süresi uzadıkça apoptoz yollarının ve koagülasyon kaskadının aktivasyonu ile geri dönüşümsüz evre başlar (Tablo 3). (42)

Tablo 3. Hücresel elemanların geri dönüşümlü ve geri dönüşümsüz histopatolojik bulguları

	Geri dönüşümlü Evre	Geri dönüşümsüz Evre
Plazma membranı	Balonlaşma oluşumu, mikrovillüslerde bozulma ve azalma, hücre iskeleti ile hücre içi elemanların bağlantı kaybına bağlı miyelinazasyon görüntüsü	Plazma membranın hücre içi elemanlardan tamamen ayrılması
Mitokondri	Ödem, yoğunluğun azalması, fosfolipid zengin yapıların birikmesi	Denatüre proteinlerden oluşan pamuk benzeri granüllerin sitoplazmaya çıkması, fosfolipid zengin yapıların aşırı çoğalmasına bağlı mitokondriyal genişleme
Hücre çekirdeği	Granüler ve fibriller yapıların bozulması	Karyolizis, piknosiz, nükleer parçalanma

Hücre içi ödem hipokside ilk bulgu olarak görülür. Hücre içi sitoplazmada ve endoplazmik retikulumda vakuoller görülür. İskemiye bağlı inflamatuvar sitokinler (TNF- α NF-K β , IL-1, IL-6...) ve endotelial adezyon moleküllerinin sentezi artar. (42) Hücrel ödemin artışıyla alınan kompozit dokuda solukluk, turgor basıncının artışına bağlı şişme ve dokunun ağırlığının artışı görülür.

Hücrede iskemiye bağlı Nikotin Adenin Dinükleotit Fostat (NAPDH) oksidazın aktivasyonu ile tiol grubu içeren glutatyon antioksidan sistemi aktive olur. Ardından glutatyonun katalizörlüğünü yaptığı glutatyon peroksidaz 4 enzimi sayesinde oluşan kararsız lipidler (lipit peroksitler) lipit alkollere dönüşür. Bu reaksiyonun aktive olamadığı durumlarda kararsız lipitler demir iyonları ile şelasyon yaparak demir-bağımlı apoptoz yollarını aktive eder, buna ferroptozis denir (Şekil 4). (43)



Şekil 4. Lipit peroksidasyonunda yaşanan bozukluklar sonrasında bu lipitler demir ile şelasyon yaparak apoptozu indükler. Buna ferroptozis denir.

2.3.1.2. Reperfüzyon Hasarı

Farklı dokularda metabolik hıza bağlı olarak oluşan az miktar iskemi dahi reperfüzyon sonrası hasarı tetikler. Oksidatif hasarın ne kadar belirgin olacağını kestirmek mümkün değildir. Örneğin, miyokard enfarktüsü sırasında 9 saatlik bir koronal damar oklüzyonu geri dönüşümsüz olarak miyokarda hasar verir. (44)

Reperfüzyon hasarının sistemik ilk etkisi von Willebrand faktörü (vWF) gibi endotelial agregasyon faktörlerinin kemotaktik etkisine bağlı olarak nötrofillerin, CD4+ T hücrelerinin ve trombositlerin mobilize olmasıyla başlar. Yine aynı dokuda oksijenazasyonun başlamasıyla reaktif oksijen molekülleri (ROM) oluşur. Nötrofiller, TNF- α ve diğer proinflamatuvar sitokin sentezini uyararak inflamatuvar

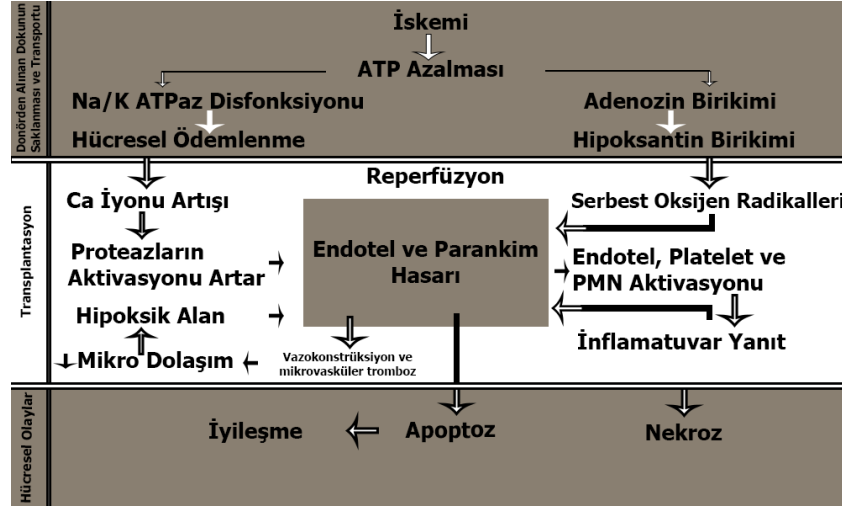
hücrelerin aktivasyonunu tetikler. Aktive olan nötrofil, makrofaj, lenfositler ve diğer inflamatuvar hücreler dokuda hasara yol açar. CD4+ T hücrelerin uyarılmasıyla makrofaj uyarıcı faktör (MUF), IFN- γ gibi faktörler sentezlenir ve bu durum makrofajları uyarır. Makrofajlardan diğer pro-inflamatuvar TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-1 gibi sitokinler salgılanır. İmmün hücreler iskemik dokuyu yoğun şekilde infiltre eder. Buradaki parankimin, endotelin ve gelen hücrelerin etkisiyle beraber yetersiz oksijenizasyon ürünü olan süperoksitler de ortaya çıkar. Bu ortaya çıkan radikaller hücre içi yıkım mekanizmalarını da uyarır. Sonuç olarak ortamda çok fazla protein yıkım ürünleri, inorganik radikaller, hücre yıkım ürünlerinin olduğu hücrelerin ve dokunun zarar gördüğü kararsız bir ortam oluşur. (45)

Dokuda bu kararsız ortamın yanı sıra sistemik olarak artan ROM ve pro-inflamatuvar sitokinlerin etkisiyle uzak organlarda da endotelial agregasyon molekülleri ortaya çıkar. Vazodilatasyonda önemli rolü olan ve vasküler permeabilitede denge rolü üstlene Nitrik oksit (NO) sentezinde bozulmalar başlar ve vazokonstrüktör etkisi olan endotelin-1 ile NO dengesi bozulur. (46) Bu durum güçlü bir vazokonstrüksiyonla sonuçlanır ve böylece uzak dokularda da trombosit agregasyonu, nötrofil kemotaksisi, dokudan salınan inflamatuvar sitokinlerin artışı, kompleman aktivasyonu olur. Bu dokularda da iskemik kalan doku gibi hasar başlar, apoptoz uyarılır ve uzak dokularda nekroz ile fonksiyon kaybı başlar.

2.3.1.3. IRH'de Mitokondrinin Rolü

Hüresel elemanların iskemi hasarında farklı farklı rolleri olur. Hücre çekirdeğinden salgılanan nükleik asit parçalarının apoptozu tetiklemesi, endoplazmik retikulumda kalsiyum dengesinin bozulması gibi çok sayıda hücre içi faktör bu değişkenler arasında yer alır. Mitokondri hücreye enerji sağlaması ve apoptoz yollarında etkin rol alması sebebiyle iskemide başlıca rolü vardır ve bu sebeple farmakolojik tedavilerde hedef rolü alır. Oksijenin azalmasıyla elektron taşıma sistemi (ETS) inhibe olur ve ATP seviyesi hücrede azalır. ATP azalmasıyla Na/K pompası yeterli çalışmaz ve buna bağlı membran stabilizasyonu bozulur (Şekil 5). Membran stabilizasyonun bozulmasından ve çoğu kalsiyum kanalının ATP bağımlı çalışma prensibi ile düzenlenmesinden dolayı hem hücre membranında bulunan kalsiyum

kanalları, hem endoplazmik retikulumda bulunan kalsiyum kanalları, hem de mitokondri membranında bulunan kalsiyum kanallarının aktivasyonu ile hücrede kalsiyum iyonu birikmeye başlar ve apoptoz yolları aktive olur. Sonuç olarak ETS bozulması ve buna bağlı değişiklikler IRH'nin temel mekanizmasını oluşturur. (47)



Şekil 5. İskemi ile hücrede enerji ihtiyacı artar. Hücresel homeostaz bozulur, ROM'ların ve kalsiyumun miktarı artar. Bu durum reperfüzyon sırasında endotelial aktivasyon ve proteazların aktivasyonuna yol açar. Endotelial hasar ve dokudaki hasarın temelinde bu yatar. Oluşan hasar apoptoz veya nekroza dönüşebilir.

Oluşan anaerobik ortam laktik asidozu tetikler, hücre içi asidik ortam ise proteazlar, lipazlar, ATPazlar gibi yıkıcı enzimleri aktive eder. Bu yapıların aktivasyonu yukarıda belirtildiği gibi iskeminin hücresel ve lokal etkilerinden sorumlu olur. Kalsiyumun birikmesi, ATP miktarının azalması gibi faktörler mitokondriyal membran stabilizasyonunu bozar ve membran geçirgenliği artar. Mitokondri zarında bulunan spesifik olmayan bazı porlar açılır. Buna bağlı olarak mitokondrinin içinde bulunan pre-apoptotik markerlerin sitoplazmaya çıkması ve apoptoz tetiklenir. Bu dengenin bozulmasıyla başta kaspaz-9 ve kaspaz-3 olmak üzere kaspaz aktivasyonu başlar. (42) Hücre ölümünün tetiklenmesiyle dokuda belirgin bir nekroz ve fonksiyon kaybı olur. Bu durum IRH'nin lokal etkisinin temelini oluşturur.

Reperfüzyon sırasında oksijenin tekrar gelmesiyle beraber bozulmuş olan mitokondriyal denge ve kalsiyum metabolizması sonucu süperoksitler, hidrojen peroksitler ve hidroksiller gibi pek çok ROM tekrar artar. Fizyolojik koşullarda az

miktar üretilen bu ROM'lar hücrel antioksidan mekanizmalarla beraber yok edilirken burada oluşan patolojik yüksek miktarda ROM hücre için toksiktir. İskemide oluşan hasara bağlı endotelial agregasyon arttığından ve sisteme inflamatuvar sitokinler gittiğinden gelen kan akımıyla bölgeye gelen nötrofiller burada birikmeye başlar. Gelen immün hücrelerden tekrar TNF- α , IFN- γ , interleokinler gibi proinflamatuvar sitokinler salgılanır. Bu durum lokal olarak bölgede hücre ölümünü tetikleyecek süperoksit iyonları ve peroksidleri de aktive eder. (48)

Reperfüzyon sırasında sistemik hasarın azaltılması için otofaji denilen bir savunma mekanizması aktif rol alır. Hücre içi bu antioksidan mekanizma beclin 1/3, fosfotidilinozitol-3 kinaz (PI3K), mTOR gibi yollar üzerinden çalışır ve yıkılmış protein granülleri ile yıkılan organellerin temizlenmesi için dinamik bir süreç başlatır. İskemik süreç başlayınca oksijen ihtiyacı artar ve hücrel boyutta ATP seviyesi azalır. Azalan ATP seviyesi adenozin-mono-fosfatla aktifleşen protein kinazı (AMPK) aktive eder ve bu da bahsedilen moleküller üzerinden bazı yolları aktive ederek o hücrelerde otofaji başlar. Otofaji ile iskemik kalan hücrelerdeki bir kısım organel ve protein yıkılmaya başlanarak ATP dengesi oluşturulmaya çalışılır. Reperfüzyon sırasında otofaji yine devam eder. (48) Otofajinin uzun süre devam etmesi aşırı bir protein yıkımına ve organel lizisine sebep olarak hücre ölümüne yol açabilir.

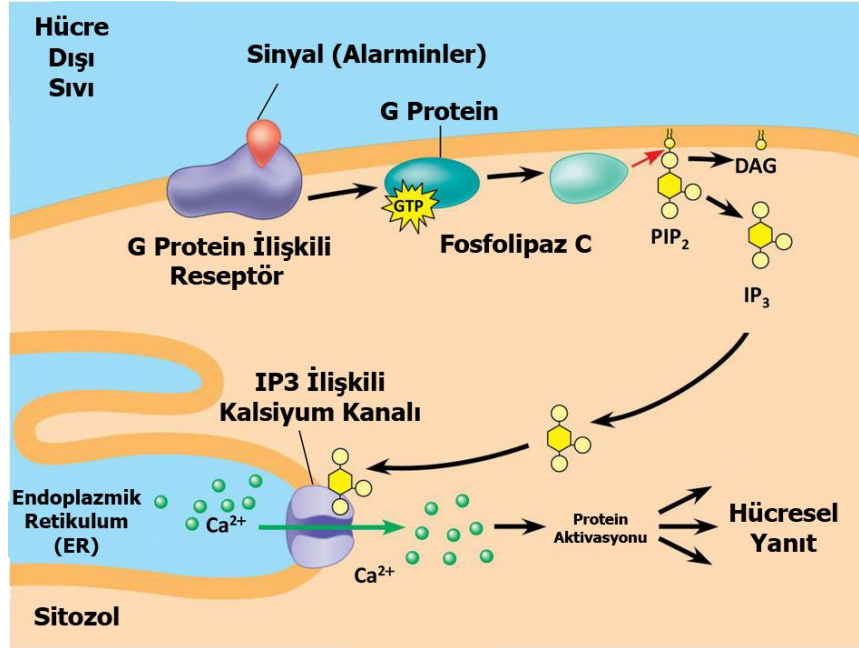
2.3.1.4. IRH'de Tehlike Sinyallerinin Rolü

Proinflamatuvar moleküllerin hücreler arası iletişimi sayesinde doğal bağışıklık sistemi hücrel apoptozu uyarabilir. İskemik kalan hücrelerde oluşan mekanizmalar sonrasında tehlike ilişkili moleküler patern (TIMP) salınımı veya yıkıma bağlı DNA parçalarının hücreler arası ortama salınması birer tehlike sinyali olarak görev görür. TIMP'ler "*toll-like-receptors*"(TLR) aracılığıyla makrofaj ve endotel hücreleri tarafından tanınır. TLR uyarısı ile beraber NF- $\kappa\beta$ üretimi hücre içinde artar, bu molekül nukleusa girerek inflamatuvar genlerin transkripsiyonunu artırır. Bu sebeple TLR inhibisyonunu veya NF- $\kappa\beta$ inhibisyonunu sağlayan RNA tedavileri IRH'yi azaltır. (49) KDT sırasında donörün kadavra olması durumunda TLR üretimi aşırı artmış görülürken sağlıklı donörlerde bu miktar daha azdır. Bu durum

kadavradan yapılan nakillerin kronik rejeksiyon süresinin kısalmasına ve rejeksiyon miktarının artmasına katkıda bulunur. (50)

2.3.1.5. Endotel Hücrelerinin IRH'de Rolü

Endotelden salınan belirteçlerin inflamasyon başlangıcında rolü vardır. Özellikle G protein aracılı adenilat siklaz ve guanilat siklaz reseptörlerinin uyarılmasıyla vazokonstrüksiyon başlar ve hücre içi sitokin salınımı gibi çok sayıda inflamatuvar sürecin tetiği çekilir (Şekil 6). İskemik kalp hastalığında, serebrovasküler hastalıklarda G protein aracılı reseptörlerde aşırı uyarılma ve bunların apoptozu indüklemesi ile inflamasyonu tetiklemesi gösterilen mekanizmalardır. (51) G protein aracılı bu reseptörlerin inhibisyonunu ise nikrit oksit (NO) sağlar. NO başlıca endotel hücrelerinden sentezlenir ve vazodilatasyonda önemli rol oynar. Dolaşımda bulunan yeterli NO sayesinde vasküler vazokonstrüksiyon oluşmayıp inflamasyon yolları aktive olmaz. İskemik durumda NO miktarının düşmesi iskemi hasarını tetikler.

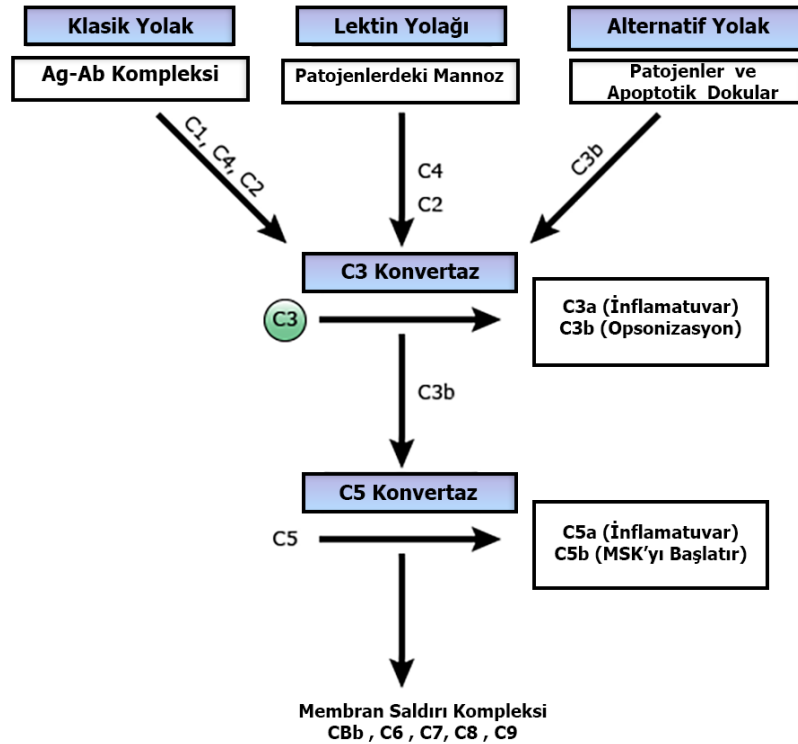


Şekil 6. Uyarının gelmesiyle beraber G protein aracılı reseptör uyarılır. Daha sonra membranda bulunan diğer fosfolipaz C'yi uyarır ve bunun sonucunda fosfotidil inozitol-3- fosfat oluşur. Bu molekülün endoplazmik retikulumunda kalsiyum reseptörlerine bağlanmasıyla kalsiyum sitoplazmaya çıkar. Daha sonra bir dizi yolak kullanarak protein kinazları aktive eder. İskemi durumunda ortaya çıkan inflamatuvar süreçlerde ve iskemi bağımlı hücre değişikliklerinde bu mekanizma önemli rol oynar.

2.3.1.6. Kompleman Sisteminin IRH'de Rolü

IRH sırasında kompleman sistemi klasik, alternatif ve lektin yollarının hepsi üzerinden aktive olur. Her 3 yolak da en sonunda C3 ve C5'i aktif formlarına dönüştürür ve membran saldırı kompleksini (MSK) aktive eder, böylece hücre boyutunda hasar başlar. (Şekil 7). (52) Kompleman aktivasyonunu inhibe eden RNA tedavilerinin ve eculizumab gibi C5 inhibitörlerinin KDT sonrasında nakledilen dokunun erken dönemde fonksiyonunu arttırdığı gösterilmiştir ancak uzun dönemde dokunun rejeksiyon miktarını etkilememiştir. Benzer şekilde çalışmalarda kronik dönemde fonksiyon ve yaşamsallık arasında fark görülemediği. (53)

Donörden organ alımı sırasında da kompleman sisteminin etkinliği farklıdır. Beyin ölümü gerçekleşmiş olan donörlerde kompleman aktivasyonu belirgin artar. Bu sebeple KDT sonrasında başarı şansı belirgin azalır. Buna bağlı olarak özellikle solid organ nakillerinde yaşayan donör hastalarda dokunun alımı öncesinde kompleman inhibisyonu sağlamak IRH'yi azaltıcı etki yapabilir. (54)



Şekil 7. Kompleman sistemi 3 ayrı yoldan aktive olabilir. Sonuçta hepsi C3 ve C5'i aktive ederek membran saldırı kompleksini aktive eder. Bu hücre yıkımını aktifleştirir.

2.3.2. İskemi/Reperfüzyon Hasarının Sistemik Etkileri

Tüm dokularda hipoksiye bağlı iskemik hasar ve daha sonra yeterli oksijenizasyon ile reperfüzyon hasarını görmek mümkündür. IRH hasarından sonra belirgin bazı mekanizmalar sistemik etkilere katkıda bulunur. Endotelial hasara bağlı gelişecek inflamatuvar sitokinlerin salınımı, koagülasyon kaskadının aktivasyonu, kompleman sistemi aktivasyonu ve bunlara bağlı SIYS sistemik etkilerden sorumlu ana mekanizmalardır. Bunların yanında reaktif oksijen radikallerinin oluşumu hem sistemik hem de lokal etkiler oluşturur.

Bu oluşan inflamasyon ortamı daha sonra uzak organlarda başta endotelde olmak üzere değişiklikler yapar. İntraselüler hücre adezyon molekülleri (IHAM) ve vasküler hücre adezyon molekülleri (VHAM) uzak organ endotelinde artar. Bunlara bağlı agregasyon ve vazokonstriksiyon tetiklenir, mikrovasküler hasar başlamış olur. Bunlarla beraber NO miktarı azalır, endotelin-1 ve NO dengesinin bozulması da iskemik hasarı uzak organlarda arttırır. Bu mekanizmaların başlaması inflamasyonu tetikler, reaktif oksijen moleküllerini arttırır ve apoptoz uzak organlarda da tetiklenir. Bu hasarın sistemik etkisi SIYS olarak adlandırılır ve karaciğer, böbrek, kalp gibi organlar başta olmak üzere her organda bir etkilenme görülür. Bu organlara ait belirteçlerin bozulması sistemik etkilerin organlara yansıdığını gösterir. ALT ve AST karaciğer için belirteç olarak kullanılabilir. Bunun yanı sıra henüz rutin klinik kullanımda olmasa da karaciğer spesifik yağ asidi bağlayıcı protein (K-YABP) hepatik hasar için daha duyarlı bir belirteçtir. (55)

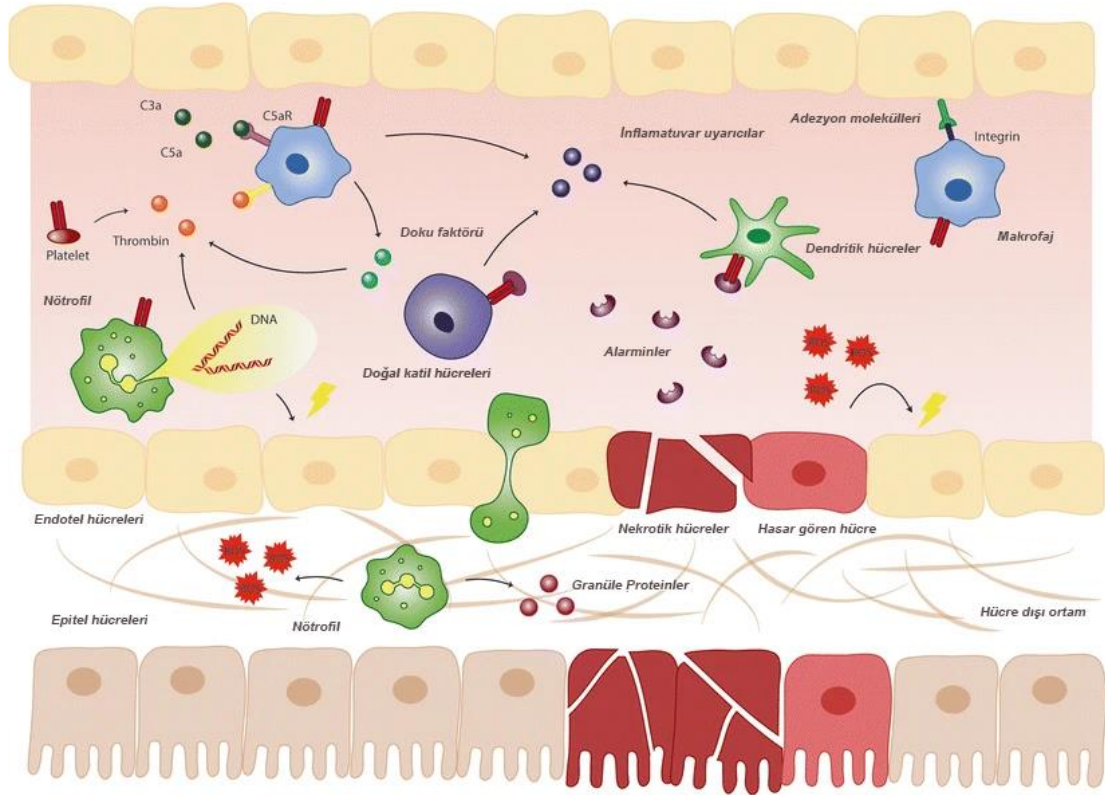
Oksitadif stresin ortaya çıkardığı renal hasar için konvensiyonel olarak GFR, kreatinin ve üre takibi yapılabilir. Renal malonildialdehit (MDA) levelinde artış ve süperoksid dismutaz (SOD) ile katalaz aktivitelerinde azalma renal etkilenmenin başladığını gösteren daha duyarlı belirteçlerdir. Serbest oksijen radikallerinin ortamdaki azaltılması ve anti-oksidan mekanizmaların devreye girmesiyle bu kan tabloları geri dönebilir. ROM'ların yüksek miktarda olması iskemi sonrası güçlü ve kalıcı bir reperfüzyon hasarı yapacakken, orta veya düşük seviyede olması iskemik ön koşullama benzeri etkiler yapıp hasarın geri dönüşümlü olmasını da sağlayabilir. (56) Bu sebeple peroksidasyonu engelleyici α -lipoik asit, glutatyon, C vitamini ve diğer bir

takım antioksidan ajanların kullanılması MDA levelini azaltan, apoptozu azaltan ve IHAM gibi molekülleri azaltarak hücrel adezyonu azaltan etkilere sahip olabilir.

Sinir sistemi oksijen ve enerji metabolizması olarak oldukça hassastır. Hipoksik ortam ve glukozun yeterli sağlanamaması geri dönüşümsüz hasarlara yol açabilir. Serebral iskemik durumlarda nöroinflamasyon mekanizması ani bir yanıt verir. İmmün sistem uyarısı, mikrogliaların aktivasyonu, sitokin oluşumu, santral sinir sistemi protein yıkım ürünleri artar. Sistemik olarak kanda belirgin IL-6 ve CRP artışı olur. Özellikle daha önceden diyabet, kalp hastalığı, hipertansiyon, sigara içiciliği ve karaciğer/böbrek hastalığı gibi komorbid durumu olan hastalarda inflamatuvar etkiler ve IRH artar. Bu hastalar başta olmak üzere reperfüzyona bağlı vazokonstrüksiyon ve sitokin fırtınası sinir sisteminde daha belirgin görülür. IRH hasarının devamında kan-beyin bariyeri bozulur, hücre ölümü başlar, kortikal nötrofil infiltrasyonu artar ve etkiler geri dönüşümsüz olarak kalıcı hale gelir. (57)

2.4. Sistemik İnflamatuvar Yanıt Sendromu (SIYS)

İmmün sistem, organizmayı patojenlere ve dış enfeksiyonlara karşı koruyan bir sistemdir. Bu sistemde bulunan hücreler enfeksiyonun veya yabancı antijenlerin olduğu bölgeye toplanır ve buradaki yabancı yapıları kontrol altına alıp ortadan kaldırmak için inflamatuvar yanıtı başlatır. Bu sistem ayrıca büyük bir cerrahi, kompozit bir antijenik dokunun alıcıya nakledilmesi gibi durumlarda da enfeksiyöz bir tablo oluşmadan inflamatuvar yanıtı başlatabilir. Bu inflamatuvar yanıtın aşırı artması durumunda geri dönüşümsüz hasar başlar ve bu durum doku hasarına, organ disfonksiyonuna ve nakledilen dokunun kaybına yol açabilir. Bu yanıtın oluşmasında inflamatuvar sitokinlerin sentezi, endotel hücrelerinin hasarı, nötrofil aktivasyonu ve glikokaliks hasarı gibi sebepler olabilir (Şekil 8).



Şekil 8. Vasküler yapı içerisinde bulunan inflamatuvar hücreler, alarminler gibi pek çok molekül hücreler arası ortamda farklı inflamatuvar yanıtlar oluşturur. Bu hücreyi etkiler.

Alarmin (Hasar ilişkili moleküler yapılar) adı verilen yapılar herhangi bir cerrahi sonrasında sentezlenebilir ve bu yapılar “*toll like receptor*” (TLR) adı verilen endotelial hücreler ve immün hücrelerde bulunan bir reseptör ailesine tutunur. Bu reseptörün aktivasyonu ile beraber hücre içinde birtakım sitokinlerin sentezini ve adezyon moleküllerinin sentezini uyararak inflamatuvar yanıtı tetikler. (58) Bu inflamatuvar yanıtın durdurulamaması durumunda aşırı bir endotelial aktivasyon, sitokin fırtınası ve immün hücrelerin aşırı birikimi ile karakterize “sistemik inflamatuvar yanıt” oluşur. Hastada oluşan bu sistemik inflamatuvar yanıtla birlikte immün hücrelerin enfeksiyona spesifik olmayışı, özellikle monositlerin fonksiyonel olarak yetersiz etkiye sahip olması, cerrahi sonrası sistemik kortikosteroid artışına bağlı immünsupresyonun artışı, cerrahi ve anestezi sırasında farklı girişimlere bağlı olarak değişken patojenlere maruziyet ve trasfüzyon gibi sebeplerden ötürü cerrahiye ikincil gelişen bir enfeksiyona yatkınlık da oluşur. (59) Fırsatçı enfeksiyonlar hastada artmaya başlar. Bu enfektif ajanlardan da “patojen ilişkili molükeler patern” (PİMP)

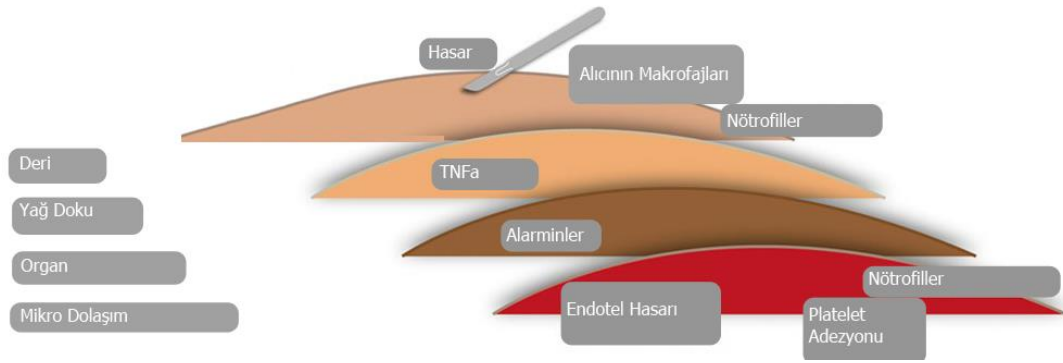
sentezi olur ve alarminlere benzer bir yolak aktive olur. Bu sebeple, enfektif ve enfektif olmayan yolakların hepsi benzer olarak bu klinik tabloyu oluşturur.

2.4.1. Doku Hasarı

Cerrahi yapılan dokularda bulunan yapıların bütünlüğünü kaybetmesi ile beraber inflamatuvar uyarıcıların sentezi başlar. Bu uyarıcılar her doku katmanında reaksiyona yol açar (Şekil 9). Bölgede endotelial geçirgenlik artar. Bu durum immün hücrelerin artışına ve bu hücrelerden sitokin sentezine yol açar. Hasar alan yerde plateletlerin azalması da trombin üzerinden vasküler geçirgenliği değiştirir. (60) Cerrahi geçiren dokuda bulunan cilt altı dokudaki adipositlerde TNF- α sentezi artar. (61) TNF- α sistemik inflamatuvar yanıt oluşumunda en temel sitokinlerdendir. Hem vasküler geçirgenliğin artışı hem de sitokin sentezi ile beraber bölgede yoğun bir ödem ve şişme oluşur. Hücresel yolakların dengesinin bozulması ile ROM sentezi artar. Kompozit dokunun antijenik yapıları da PİMP gibi davranarak yine alıcının immün hücrelerini uyarır ve sistemik inflamatuvar yanıt daha da artar. Bütün bunlar inflamasyonun geri dönüşümsüz aşamaya geçmesine sebep olur.

2.4.2. Alarminler

Cerrahi geçiren organizmada kendi dokularından alarminler (Hasar ilişkili molüker paternler/TİMP) salınır. Bu moleküller PİMP'lerle evrimsel olarak benzer özellikler taşır ve aynı reseptörler üzerinden inflamasyonu tetikler. Temelde alarminler endojen hasarlı hücrelerin mitokondriyal DNA kalıntıları iken, PİMP'ler eksojen patojenlerin DNA kalıntılarıdır. Alarminler ayrıca birtakım proteinlerin yıkım ürünleri de olabilir. (62) Alarminler ayrıca hücre dışı matriks bileşenleri ve glikokaliks kalıntılarından da oluşabilir. (63) Bu yapıların aktivasyonu kompleman sistemini de lektin yolağı üzerinden aktive eder ve hücresel yıkımı tetikleyebilir. Yine alarminler TLR üzerinden hücresel yolakların bir kısmını aktive ederek inflamatuvar yanıtı tetikler (Şekil 9).



Şekil 9. Hasar sonrasında endotel, platelet ve inflamatuvar hücrelerin aktivasyonu ile sistemik inflamatuvar yanıt başlar.

2.4.3. Sitokin Dengesinin Bozulması

Makrofajlar, doğal katil hücreleri ve lenfositlerden salgılanan; interlökinler, uyarıcılar, büyüme faktörleri, interferonlar ve diğer inflamatuvar uyarıcı peptidlerin tamamına sitokin denir. (64) Cerrahi geçirme, stres, enfeksiyon ve diğer vücudun dengesini bozan her durumda kandaki sitokin miktarı değişebilir. 1998 yılında yapılan bir çalışmada majör cerrahi geçiren hastalarda cerrahiden hemen sonra TNF- α , IL-1, IL-6, IL-10 miktarlarının değişimi akut olarak görülmüştür ve bu durum cerrahi öncesi döneme göre büyük farklılık göstermiştir. (65) Bu sebeple kompozit doku nakilleri de sitokinlerin aşırı değişimine sebep olabilir. (3) Sitokinlerin artması ile beraber nötrofillerin, makrofajların, plateletlerin ve diğer immün sistem hücrelerinin aktivasyonu değişir. Bu durum hasar gören bölgede kemotaksis, hücre proliferasyonu, mikrovasküler bozuklukları ve koagülopatileri tetikler.

Bu sitokinlerin artışı ile oluşan değişimler organizma tarafından sınırlandırılır. Ancak özellikle büyük cerrahiler, yüksek antijenik yük ve IRH sonrasında bu sınırlama oluşamayabilir ve sitokin fırtınası dediğimiz durum oluşur. Bu durumda hücresel ölüm başlar ve doku hasarı gelişir. (66)

2.4.4. Endotelial Aktivasyon

Sitokinlerin artışı, ROM sentezi ve inflamatuvar hücrelerin artışı endotelial fonksiyonları bozar. Bunun sonucunda hem endotelial hücre aktivasyonuna bağlı von Willebrand faktörü (vWF) artışına bağlı platelet agregasyonu hem de selektinler gibi adezyon moleküllerinin artışına bağlı nötrofil infiltrasyonu artar. Endotel yapısı

fizyolojik koşullarda bir bariyer görevi görürken inflamatuvar yanıtın geri dönüşümsüz olarak aşırı artmasıyla beraber doku hasarını yapan temel mekanizmaları uyarır. Hem koagülasyon kaskadı hem de kompleman aktivasyonu sistemik olarak artar. (67)

2.4.5. İmmün Hücre Birikimi

Doku hasarı ile beraber alarmin sentezi artar. Buna bağlı olarak inflamasyon tetiklenir. Endotellerde bulunan selektin moleküllerinin artışı ile beraber lenfositler inflamatuvar bölgede birikmeye başlar. Lökositlerde kemokin reseptörü ekspresyonu artar. VLA grubu reseptörler ve CXC reseptörleri adezyonun artışıyla sağlanan, hasarlı dokuya lökosit göçüne sebep olan temel reseptör mekanizmalarıdır. (68)

Makrofajlar inflamasyon sırasında hem proinflamatuvar hem de anti-inflamatuvar süreçleri yöneten temel hücrelerdir. Plateletlerin monositlerle hücrel etkileşimi ile beraber monositlerin makrofajlara değişimini uyarır. Kemokin salınımının artışı ile beraber makrofajların aktivasyonu ve hasarlı bölgeye göçü artar. İnflamatuvar sitokinlerin artışı ile beraber makrofajların fagositik etkisi artar ve doku hasarını arttırır. (69)

2.4.6. SIYS kliniği

SIYS sonrasında otonomik, endokrin, hematolojik ve immünolojik değişimler olur. Hemodinamik stabilite bozulur. Vasküler yapı içerisinde yeterli basıncı ve hacmi tutmak zorlaşır ve vasküler içerik doku sıvısına doğru yer değiştirir. İntravasküler hacmin yetersiz olması sebebiyle kalp atımı artar, ancak bu artış kan basıncını yeterli seviyede tutamaz. Homeostazis bozulur ve vücut sıcaklığı regülasyonu bozulur. Buna bağlı normotermik değerler yerine hipotermik/hipertermik vücut sıcaklığı görülür. Proinflamatuvar sitokinlerin aşırı artışı ile lökositlerde aşırı bir artış olur. (69)

SIYS geliştikten sonra tedavi edilemeyen durumlarda klinik olarak multi organ yetmezliği oluşur. Serebral ensefelopati, akut respiratuvar distres sendromu, kalp yetmezliği, gastrointestinal stres ülserleri, renal tübüler nekroz, karaciğer yetmezliği, koagülopatiler ve adrenal yetmezlik gibi birçok klinik tablo beraber görülebilir. (60)

2.5. İskemi/Reperfüzyon Hasarı İçin Tedavi Yöntemleri

IRH'nin akut dönemde etkili bir tedavisi olmadığı için en iyi tedavi modalitesi oluşmadan önlenmesi olarak sayılabilir. Ancak kronik dönemde yerleşen IRH için bir takım tedavi yöntemleri geliştirilmiştir. Hem iskemi anında hem de reperfüzyonda farklı immünolojik ve inflamatuvar yollar üzerinden etkiler görülebildiğinden iskemi/reperfüzyon hasarına karşı üretilen ilaçların mekanizması çok yönlü olabilir. Hücre apoptozunu önleyen, IRH hasarını azaltan, anjiogenezisi etkileyen ilaçlarla beraber hücresel rejenerasyonu arttıran C vitamini, tokoferoller ve glutatyon gibi direk yollarda yer alan ilaçların yanı sıra bunların mimetik etkilerini sağlayan sentetik ilaçlar da sıklıkla kullanılmaktadır. (46) Kullanılan farmakolojik ilaçlar tüm mekanizmalara birden etki edemeyeceğinden tamamen IRH'nin önüne geçmek mümkün değildir. Bu sebeple iskemi reperfüzyon hasarını en başta oluşmadan engelleyecek manevralar, metabolik duruma müdahaleler de ekstrinsik olarak IRH için birer tedavi amacı sayılabilir.

2.5.1. Hücresel Yollar Üzerinden Geliştirilen Tedavi Modaliteleri

Hücre içi “hayatta kalmayı arttırıcı faktörleri arttırma” (HAFA) ve “reperfüzyon hasarını geri dönderen kinaz” (RHGK) ve cGMP/PKG yolları temel tanımlanan IRH engelleyici yollardır (Şekil 12). (70) Hipoksi ile uyarılan faktör (HUF), NF κ B yolağı, apoptoz engelleyici yollar gibi çok sayıda yolak üzerinden tedavi geliştirme çalışmaları devam etmektedir.



Şekil 10. RHGK yolağı G protein üzerinden çalışır. Hormonların büyük kısmı bu yolağı aktive eder. İskemik ön koşullama ve hafif düzeyde iskemik hasar bu yolak üzerinden hücre apoptozunu azaltır ve hücrede antioksidan mekanizmaları uyarır. HAFA yolağı TNF, sitokinler, interlökinler ile uyarılır ve yine apoptozu engeller.

Apoptozu engellemek için en eski tedavi modalitelerinden birisi mitokondriyal membran porlarının aktivasyonunu etkileyen ilaçlardır. Siklofilin D inhibisyonu sayesinde nekrotik hücre ölümünün azaltılması amaçlanır. (71) Siklofilin D, siklosporinin yüksek afinite ile inhibe ettiği moleküldür. Siklosporinin immünsupresyon ve transplantasyonda yüksek kullanım alanı olduğu bilinmektedir. Ancak güçlü yan etkileri sebebiyle siklosporin yerine siklofilin bağlayıcı diğer proteinler de deneysel olarak kullanımdadır. (72) Polilaktik asit/poliglitolik asit nanopartiküllerinin içine yerleştirilmiş direk mitokondri hedeflenen siklosporinin reperfüzyon sırasında yan etkiden ziyade siklofilin D üzerinden kardiyoprotektif olduğu gösterilmiştir. (73) Vazodilatör olarak kullanılan nitrogliserinin siklofilin D'yi inhibe ederek tavşanda IRH'yi engellediği de gösterilmiştir. (74) Bunun yanında çok fazla sayıda sentetik siklofilin D inhibitörünün de üretimi ve IRH üzerinde etkinliği araştırılmaktadır.

Mitokondriyal ATP bağımlı potasyum kanallarının (mKATP) iskemi/reperfüzyon sırasında aktivasyonu da hücre ölümünü azaltır. mKATP agonisti nikorandil ve kromakalim bu yolak üzerinden IRH'yi engeller. (75) Mitokondriyal

solunum kompleksleri normal koşullarda enerji üretimi için en önemli yapı taşı iken reperfüzyon sırasında oksijen radikallerinin oluşumunu hızlandırır. Bu sebeple reperfüzyon sırasında antagonist ilaç kullanımı deneysel olarak ROM oluşumunu azaltır.

Hipoksik ortamda bir diğer uyarılan faktör ise HUF'tur. HUF miktarının artışı hem oksijenaz-1 gibi yolları aktive eder. Hücresel boyutta antioksidan mekanizmalar tetiklenir. Deneysel olarak alfa lipoik asitin kompozit dokuya dolaşım sağlanmadan verilmesi glutatyon sentezini, aktifleştirilmiş E vitamini oluşturulmasını ve HUF aktivasyonunu artırır. (76)

2.5.2. Diğer Yollar Üzerinden Geliştirilen Tedavi Modaliteleri

Bazı anti inflamatuvar ve anti-apoptotik yollar hücresel belli bir yolak üzerinden değil de çok fazla yolak ve etki ile IRH'yi engeller. Direk inflamasyonun engellenmesi, hücre adezyonunu engellenmesi, trombosit agregasyonunu engellenmesi gibi mekanizmalar bunlara örnek gösterilebilir. Örnek olarak metilprednizolonun IRH'yi engellemesi çok mekanizmalı etkinliğe örnektir.

Antioksidan etkinliğe sahip ilaçlar ROM oluşumu ve onların nötralizasyonunu artırır, inflamasyonu azaltır, mitokondri kaynaklı hücre ölümünü baskılar. Kandesartan, glutatyon, minosiklin, aldehid dehidrogenaz, N-asetilsistein, melatonin gibi ajanlar bu şekilde etki eder. (77)

Anjiogenezin artışı ile beraber hipoksinin dokuda oluşturacağı iskemik hasarın azaltılması da bir hedef olabilir. Diyabet hastalarında glukojenik dengenin sağlanmasını sağlayan metforminin bunun yanında anjiogenik etkisi vardır. Bu sebeple diyabetin vasküler komplikasyonlarında da belirgin azalma sağlar. Anjiotensin inhibitörü kandesartan antioksidan etkilerinin yanı sıra matriks metalloproteinaz-2 (MMP-2) ve vasküler endotelial büyüme faktörü (VEBF) miktarını artırıp anjiogenezini artırır. Anjiogenezdeki artış dokuya giden kan miktarını arttıracığından oksijenizasyona artar ve iskemik hasar buna bağlı olarak azalabilir. (78)

Matriks metalloproteinaz aktivasyonu IRH sırasında artar. MMP'lerin ekstraselüler matriks düzenlenmesi, immün sistemin regülasyonu, kan beyin

bariyerinin stabilizasyonu gibi çok sayıda fonksiyonu vardır. İskemi/reperfüzyon sırasında intraselüler yolakları da etkileyip hasarın artmasına yol açarlar. Reperfüzyon sırasında MMP inhibitörlerinin kullanımı IRH'yi azaltıcı etki yapar. Bu inhibitörler çok sayıda yolak üzerinden çalıştığından sistemik etkileri de fazladır. Bu sebeple daha selektif MMP inhibitörlerine ihtiyaç vardır.

Hipoksik ortamda ATP azalmasına bağlı olarak kalsiyum birikimi artar. Kalsiyum artışının diğer etkilerinin yanı sıra NADPH oksidaz enzimini de hiperaktive eder. Bu enzimin inhibitörlerinden olan aposinin uygulandığında antioksidan etkiler artar, glutasyon sentezi hızlanır ve iskemiye bağlı oluşacak hipoksik hasarlar azalır. (79)

2.5.3. Hiperbarik Oksijen Tedavisi

Hiperbarik oksijen tedavisi (HOT) mekanizması tam bilinmemekle beraber farklı alanlarda kullanılır. Bu alanlardan birisi de IRH'yi engellemektir. HOT iskeminin başlarında kullanıldığında dokuya giden oksijen miktarını artırır, sirkülasyon hızlanır ve hipoksik/iskemik hasar azalır. Bu durum perfüzyonu artırır, anjiogenezi tetikler, nötrofil adezyonunu ve vazokonstrüksiyonu belirgin azaltır. HOT tedavisi ayrıca superoksit dismutaz, katalaz gibi antioksidan ajanların aktivasyonunu artırır, büyüme faktörü salınımını tetikler ve sitokin oluşumunu düzenler. Isı şok proteini denilen anti-apoptotik proteinlerin oluşumunu artırır. IRH sırasında vücudun direncinde belirgin düşüklük olup enfeksiyon ihtimali artar. HOT tedavisinin bakterisit etkinliği bulunur ve enfeksiyonu azaltır. HOT sayesinde reperfüzyon sırasında oluşacak sistemik etkiler azalır.

2.5.4. Kompozit Dokuyu Koruyucu Yöntemler

İskemi ve sonrasında buna bağlı reperfüzyon hasarı alıcıda çok farklı etki yapabilmektedir. Alıcıda sadece rejeksiyon ataklarının olması, komorbit durumların oluşması, olayın SIYS'e dönüşüp ardından mortaliteye dönüşmesi gibi geniş bir yelpazede sonuç görülebilir. Fazla sayıda mekanizma IRH'de aktive olmaktadır ve bunlara da farklı tedavi modaliteleri geliştirilmiştir. Tedavi modalitelerinin yanında

koruyucu mekanizmalar da IRH'nin etkinliğini azaltabilir. İskemi zamanının azaltılması hasarı azaltıcı en temel manevradır.

Kompozit dokunun taşınması ve saklanması için en temel yöntem kompozit dokunun soğukta saklanmasıdır. Soğukta saklama dokunun metabolit hızını ortalama her 10°C'de 2 kat kadar azaltır. Dokularda geri dönüşümsüz hasarın başlaması normotermik koşullarda daha kısa sürerken soğuk koşullarda saklamak iskemideki geri dönüşümsüz hasar süresini uzatır. Soğukta taşınma ve saklanma dahi olsa sürenin 12 saatten fazla uzaması, normotermik koşullardaki gibi geri dönüşümsüz hasarın ortaya çıkmasına sebep olur. (22) Daha önceki çalışmalarda HLA uyumunun en yüksek olduğu koşullarda bile uzamış soğuk iskemi rejeksiyonu ve greft kaybını arttırdığı gösterilmiştir. (80) Soğukta saklama sırasında dokunun metabolit aktivitesi azalır. Buna bağlı oksidatif fosforilasyon yavaşlar ve ATP sentezi azalır. Buna bağlı olarak azalan metabolik ihtiyacı karşılamak için anaerobik fosforilasyon başlar ve dokuda laktat düzeyi yükselir. Buna bağlı olarak hücre hasarı gelişir ve reperfüzyon sırasında lökosit adezyonu ile başlayan immün yanıt oluşur. (80)

Dokunun korunmasını sağlamak amacıyla farklı solüsyonlarda bekletmek bir diğer yöntem olarak kullanılabilir. Wisconsin solüsyonu bu amaçla üretilmiş ve kompozit dokunun veya solid organın taşınması sırasında koruma amacıyla kullanılmıştır. Dokunun soğukta saklanması veya normotermik koşullarda bekletilmesine göre bu şekilde, belirli metabolitleri içeren bir solüsyonda saklanması fonksiyonel olarak geri dönüşü artırır. 1994 yılında Strome ve arkadaşları tarafından yapılan laringeal transplantasyon modelinde kompozit dokunun iskemi süresinin 3 saat olarak belirlendiği ve Wisconsin solüsyonunda bu sürenin 24 saate kadar uzadığı gösterilmiştir. (81)

İskemik ön koşullama yöntemi IRH'yi azaltan metotlardan birisidir. Ekstremitayı veya solid organı belirli kısa periyodlarla iskemik bırakıp daha sonra reperfüze etmek IRH hasarını önleyici etkinliğe sahiptir. Ön koşullama sayesinde oluşacak proinflatuvar sitokinler ve aktive olacak immünhücrelerde bir azalma görülür.

2.5.5. Extrakorporeal Perfüzyon Sistemi

Yeni bir yöntem olarak iskemik zamanın azaltılması için ekstrakorporeal dolaşım modelleri geliştirilmiştir. Öncelikle 1968 yılında solid organlarda kullanılmaya başlayan bu yöntem KDT sırasında özellikle ekstremitelerde oluşan IRH'yi azaltmada kullanılabilir.(82) Ekstrakorporeal dolaşım sistemlerinde temel amaç dokuya yeterli oksijen ve besin sağlamak, oluşan metabolitlerin uzaklaştırılmasını sağlamaktır. Bu şekilde yapılan doku ve organ saklama yöntemlerinde fonksiyonel başarı daha yüksektir ve geri dönüşümsüz hasarlar daha geç ortaya çıkar. Aynı şekilde perfüzyon sırasında kompozit dokuya antikoagülan, antibiyotik veya anti inflamatuvar ajanların verilmesi başarıyı daha da arttıran yöntemler olarak sayılabilir.

Ekstremitte transplantasyon ve replantasyonlarında en önemli başarı kriterlerinden bir tanesi oluşacak IRH'yi azaltmaktır. Her ne kadar solid organ transplantasyonlarında soğukta saklama veya özel solüsyonlarda saklama yöntemleri yeterli gelse de ekstremitte nakilleri sırasında dokudaki yoğun kas kitlesinden dolayı iskemik süreçte oluşan metabolitler daha fazladır. Kas dokusunun hipoksiye karşı duyarlılığının da daha fazla olduğu düşünüldüğünde bu tür yüksek hacimli dokularda, iskemi sırasında dokuya oksijen ve besin desteğinin sağlanması ve fizyolojik bir ekstraselüler ortam yoğunluğunun oluşturulması KDT sonrasında dokunun yaşamsal açıdan daha iyi sonuçlarının olacağını düşündürür.

2.6. Bu Çalışmada Bakılan Parametreler

Bu çalışmada yukarıda belirtilen mekanizmalardan oksidatif stresi araştırmak için TAS, TOS, SOD, katalaz, total tiol; inflamatuvar belirteçleri araştırmak için TNF- α , NF-K β ve IL-10; apoptoz düzeyini anlamak için bcl-2 ve bax; biyokimyasal belirteç olarak Na, K, LDH, CK, myoglobin ve laktat bakıldı.

2.6.1. Oksidatif Hasar İçin Bakılan Parametreler

2.6.1.1. TAS

Organizmada oksidatif hasarla beraber pek çok yolak aktive olur. Bu yolakların bir kısmı antioksidan mekanizmalarla uzaklaştırılmaya çalışılır. Antioksidan sistemler, metal iyonlarını şelatlayarak radikal oluşumunu önleyebilen, radikalleri daha kararlı hale getirebilen, oksidanları hidrojen kullanarak inaktive edebilen ve oksidatif hasardan dolayı yapısı bozulmuş molekülleri onarabilen mekanizmalardır. (83) Antioksidan sistemler hücre içi ve hücre dışı kökenli olabilir. SOD, katalaz, glutatyon gibi hücre içi elemanlar; C vitamini, karotenler, flavonoidler gibi hücre dışı antioksidanlar organizmada daima bir denge içinde bulunur. (84)

Antioksidanların ayrı ayrı ölçümü oldukça güç ve pahalı bir yöntem olarak karşımıza çıkar. Bu sebeple bu çalışmada Erel ve arkadaşlarının yöntemi kullanıldı. Yöntemde; renkli ABTS radikalinin (koyu yeşil), serumda bulunan antioksidanlar tarafından renksiz indirgenmiş forma dönüşümü ile TAS miktarı ölçülür. Renkte değişim 660 nm dalga boyundaki absorbans ölçümüyle tespit edilir. Analiz bir E vitamini analogu olan Trolox eş değeri olarak adlandırılan stabil bir antioksidan standart çözelti ile kalibre edilerek ölçülen antioksidan miktar mM Troloxequiv/L olarak verilir. (85)

2.6.1.2. TOS

Endojen ve ekzojen oksidatif stres kaynaklarının tamamı oksidan olarak adlandırılır. Mitokondriyal ETS zincirinin yan ürünleri, endoplazmik retikulumda oluşan kararsız yan ürünler, sitozolde enzimatik aktiviteler sonrasında oluşan oksijen radikalleri, hücre membranında bulunan araşidonik asitin metabolizması sonrası oluşan kararsız lipid peroksitler, immün hücrelerin savunma amaçlı patojenlere karşı oluşturduğu ürünler, zararlı gazlar ve iyonların oluşturduğu etkiler oksidanlar olarak sayılabilir. Bütün bu oluşan yan ürünler süperoksit iyonları, hidrojen peroksit, kararsız hidroksil iyonları ve kararsız oksijen molekülleri olarak sınıflandırılabilir ve bunların tamamına ROM denir. (86) (87)

Bahsedilen tüm bu moleküllerin miktarı sabit değildir ve sürekli değişim halindedir. Hepsinin tek tek ölçülmesi bir yöntem olsa da zaman ve ekonomi açısından uygulaması akıllıca sayılmaz. Bu sebeple tüm oksidanların durumunu yansıtan TOS ölçümü Erel ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. Bu kolorimetrik yöntemde; ferröz iyon-o-dianisidin oksidanların tamamı ferrik iyon oksitlenir. Ferrik iyon ise asidik ortamda ksilenol turuncusu ile reklı bir kompleks yapar. Bunun absorbans miktarı TOS değeri ile korole şekilde ölçülür. (88)

2.6.1.3. SOD

Oksidatif hasar sonrası oluşan ROM'ların içerisinde süperoksit radikalleri geniş yer tutar. SOD enzimi tarafından süperoksitlerin hidrojen peroksit'e çevrilmesi antioksidan primer savunma mekanizmasıdır. Bu dönüşüm yapılmazsa süperoksitler diğer kararsız oksidatif ürünlere dönüşür. SOD enzimi primer bir savunma mekanizması olduğundan oksijenli solunum yapan tüm organizmalarda bulunur. SOD enzimi metal iyonlarına bağlıdır ve 3 tipi vardır. Sitozolda bulunan CuZnSOD, mitokondride bulunan MnSOD ve hücre dışı CuZn bağımlı SOD olmak üzere organizmada oksidatif hasar ile her aşamada savaşır. Ekstraselüler olarak bulunan tek enzimatik antioksidan SOD enzimidir. (89)

Bu çalışmada bu sebeple SOD enzimi ölçümü yapıldı. Ksantin oksidaz enzimi WST-1 ile oksijeni reaksiyona sokup formazan boyası üretir. Formazan boyası oksijen radikallerini boyar. Ortamda bulunan SOD oksijen radikallerini azaltır. Bu sebeple 450 nm dalga boyunda WST-1 yan ürünü ölçümü ile SOD miktarı gösterilebilir.

2.6.1.4. Katalaz

Primer antioksidan mekanizmalardan sorumludur. ROM'ların oluştuktan sonra suya indirgenmesinde görev alır. SOD tarafından oluşturulan hidrojen peroksitin suya dönüşümünü sağlayan iki enzimden birisidir (Diğer enzim glutatyon peroksidaz). Düşük hidrojen peroksit düzeylerinde enzimatik aktivitesi az olup bu dönüşüm daha çok glutatyon peroksidazla olurken hidrojen peroksit düzeyi arttıkça katalaz enzim aktivitesi artar. (90) Katalaz enzimi hem grubu içerir ve yüzeyinde NADPH molekülü

bulunur. Hücrede dağılımı peroksizomların içindedir. Karaciğerde yoğun olarak bulunurken diğer dokularda miktarı daha azdır. (91)

2.6.1.5. Total Thiol

Sülfidril grubu (-SH) içeren bileşiklere thiol denir. Antioksidan savunma mekanizmasında rol oynarlar. Temel olarak sülfidril bulundural yapılar; protein tioller, sistein, homosistein, glutatyon ve taurindir. Protein tioller özellikle plazmada bulunan, (-SH) grubu içeren, albümine bağlanabilen ve oksidanlarla bağlanıp onları nötralize eden yapılardır. (92) Hücre içinde bulunan glutatyon; mitokondri, endoplazmik retikulum ve hücre çekirdeğinde bulunan, hücresel oksidasyon ve redüksiyon tepkimelerini düzenleyen bir yapıdır. Oksidatif hasar sırasında glutatyon artar ROM'ların glutatyonun yapısındaki sisteine bağlanıp nötralize olması ile antioksidan etki sağlanır. Ayrıca SOD tarafından üretilen hidrojen peroksitein suya indirgenmesinde rol oynayan peroksidazlar, hidrojen peroksitein yapısındaki kararsız bileşikleri glutatyon üzerine aktararak bu enzimatik aktiviteyi sağlar. (93) C ve E vitaminleri glutatyonun çalışması için elzemdir. (94) (95) Taurin ise mekanizması tam bilinmemekle beraber thiol gruplarının yenilenmesini sağlayarak antioksidan etkiye katkı sağlar. (96) Total thiol miktarı bu sebeple antioksidan birçok yapının tamamının miktarı hakkında fikir verir.

2.6.2. İnflamatuvar Şiddeti Ölçmek İçin Bakılan Parametreler

2.6.2.1. TNF- α

Sistemik inflamasyonda rol alan lenfositler, doğal katil hücreleri, nötrofiller, mast hücreleri, endotel hücreler ve makrofajlardan sentezlenen bir sitokindir. Diğer proinflamatuvar sitokinlerin salınmasını uyarır. NF- κ B yolağı aracılığıyla inflamasyonu tetikler ve kaspaz3, kaspaz-9 aktivasyonu ile apoptozu uyarır. (97)

Doku hasarı sonrasında endotel aktivasyonu ile bölgeye göç eden immün hücreler tarafından sentezlenen ilk inflamatuvar sitokindir. Bu sebeple iskemi sırasında da miktarı artar. Miktarının artması ile diğer proinflamatuvar sitokinlerin sekresyonu artar ve inflamasyonun sistemik etkisi artar.

2.6.2.2. NF-κB

NF-κB inflamatuvar ve immün olaylarda aktivitesi artan bir transkripsiyon faktörüdür. Normal koşullarda hücrede sitoplazmada inaktif bir şekilde durur. Ancak proinflamatuvar sitokinler, hücrel hasar, ekzojen uyarılar gibi sebeplerle aktive olup hücre çekirdeğine geçer. Özellikle TNF-α uyarısı sonrası aktive olur. (98) Aktivasyonu ile beraber proinflamatuvar sitokin sentezi artar, immün hücrelerin aktif hale dönüşmesini uyarır. En fazla makrofajlarda bulunur. (99) Alarminler ve PAMP'ların uyarısı ile de makrofajlarda NF-κB yolağı aktive olur ve çok sayıda inflamatuvar sitokin salınır. Bu durum sistemik inflamasyonu tetikler. (100)

2.6.2.3. IL-10

İmmün sistemde doku hasarı veya patojenlere karşı gelişen inflamatuvar yanıt kendini sınırlamadığı sürece her zaman büyük hasarlara yol açabilir. Bu sebeple proinflamatuvar sitokinleri baskılayacak, doku hasarını azaltacak anti-inflamatuvar mekanizmalara ihtiyaç vardır. (101) İnflamasyonu engelleyen en önemli sitokinlerden birisi IL-10'dur. Bu sitokin hücrelerde başta TNF-α sentezi olmak üzere proinflamatuvar sitokinlerin sentezini engeller. Başlıca yardımcı T₂ hücrelerinden sentezlenir ve immün hücrelerin aktivasyonunu da engeller. (102)

IL-10 reseptörü hücrede JAK/STAT yolağını başlatır ve daha önce de bahsedildiği gibi bu yolağın aktivasyonu hücre sağkalımını arttırır. Ayrıca IL-10, NF-κB'nin aktive olmasını engeller. (103) Özellikle akut enfeksiyonlar, inflamasyon ve doku hasarında lokal ve sistemik etkilenmeleri engellemek için IL-10 miktarı artar. İnflamasyon sonrasında düzeyi erken dönemde değişir.

2.6.3. Apoptoz İçin Bakılan Parametreler

Bcl-2 protein ailesinde bax, bad, bim, bid, bad gibi proapoptotik, bcl-2, bcl-xl, bcl-x, BAG gibi anti-apoptotik proteinler bulunur.

2.6.3.1. Bax Proteini

Bcl-2 protein ailesinin bir üyesi olan bax proteini pro-apoptotik bir proteindir. Pro-apoptotik proteinler içerisinde aktivitesi direk apoptozun intrinsik yolağı ile

bağlantılı olan proteinlerdendir. BH-3 ve bcl-2 gibi anti-apoptotik proteinler tarafından pro-apoptotik proteinlerin aktivitesi kontrol edilir. Bax proteini apoptotik dış sinyaller hücreye ulaştığında aktive olduktan sonra apoptozu başlatan intrinsik yolları aktive eder. (104) Mitokondriyal membranda oluşan hasara bağlı mitokondri dış membranında geçirgenliğin değişmesi de bax proteininin aktivasyonunu sağlar. (105) Bax aktivasyonu aynı zamanda mitokondriyal sitokrom C'nin serbestleşmesini uyarır. Buna bağlı şekilde kaspazlar aktive olur ve apoptoz başlar. Bax miktarının artışı apoptozun belirtecidir. (106)

2.6.3.2. Bcl-2 Proteini

Bcl-2 proteini apoptozda mitokondriyal fonksiyonun düzenlenmesinde rol alan temel proteinlerdendir. Proteazlar, p53 reseptörü, Ras reseptörleri, bax, bad gibi birçok proteinin miktarını ve dağılımını etkileyerek anti-apoptotik etki gösterir. Aynı zamanda mitokondriyal geçirgenliği inhibe ederek sitokrom c'nin sitozole çıkmasını engeller ve kaspaz aktivasyonlarını inhibe eder. Bu sebeplerden ötürü miktarındaki artış apoptozu karşı koruyucudur. Bcl-2 miktarının azalması bax miktarının artışı ise apoptozu gösterir. (106)

2.6.4. Biyokimyasal Belirteçler

İskemi-reperfüzyon hasarı, kan akımının durup daha sonra metabolik bir yüklerle beraber geri sağlanmasına bağlı olduğundan moleküler olayların karmaşık bir etkileşimini temsil eder. Bu karmaşık süreç, kreatin kinaz (CK), miyogloblin, laktat, laktat dehidrojenaz (LDH), Na ve K gibi biyokimyasal belirteçlerde, belirginleşen hücresel hasar ve işlev bozukluğuna bağlı değişimlere yol açar.

2.6.4.1. Kreatin Kinaz (CK)

Öncelikle kalp ve iskelet kasları gibi yüksek enerji ihtiyacı olan dokularda bulunan CK, enerji metabolizmasında temel bir rol oynar. İskemik koşullarda, oksijen eksikliği ATP üretimini bozarak hücreleri anaerobik metabolizmaya başvurmaya zorlar ve CK'nın işlevini tehlikeye atar. Reperfüzyon, oksidatif stresi indükleyerek hücre hasarını ağırlaştırır ve CK'nın kan dolaşımına salınmasına neden olur. Yüksek serum CK seviyeleri, hücresel hasar için önemli bir tanısal belirteç görevi görür ve iskemi-

reperfüzyon hasarını takiben miyokard enfarktüsü ve kas hasarının teşhisine yardımcı olur. Bu sebeple özellikle kas iskemi reperfüzyon modellerinde anlamlı olarak miktarı değişir.(107)

2.6.4.2. Myoglobin

Kas hücrelerinde oksijen depolanmasından sorumlu olan myoglobin, iskemi sırasında doku hasarını takiben kan dolaşımına salınır. Hücresel parçalanma nedeniyle myoglobin seviyelerinde artış gözlenir. Reperfüzyon sırasında, salınan myoglobin oksidatif stres ve inflamasyona katkıda bulunarak doku hasarını şiddetlendirir. Yüksek serum myoglobin seviyeleri kas hasarının göstergesidir ve CK ile birlikte miyokard enfarktüsü ve iskemi-reperfüzyon hasarından kaynaklanan iskelet kası hasarı gibi durumların teşhisinde değerlidir. (107)

2.6.4.3. Laktat

İskemi sırasında anaerobik solunuma geçiş, oksijen kaynağı hücresel taleplerin gerisinde kaldığı için laktat birikimine yol açar. Reperfüzyon aerobik metabolizmanın yeniden başlamasını sağlar, ancak hasarlı hücreler bozulmuş mitokondriyal fonksiyonuna devam ederek kalıcı laktat birikimine neden olabilir. Yüksek serum laktat seviyeleri doku hipoksisini ve iskemi-reperfüzyon hasarının şiddetini yansıtarak hücresel hasar ve metabolik tehlikeye ilişkin bilgiler sunar. (108)

2.6.4.4. Laktat Dehidrojenaz (LDH)

Çeşitli dokularda bulunan LDH, iskemi sırasında hücresel hasarı takiben kan dolaşımına salınır. Hücresel hasar ve membran bozulması nedeniyle LDH seviyelerinde artış meydana gelir. Reperfüzyon hücre hasarını artırarak LDH salınımının artmasına neden olur. Serum LDH seviyeleri doku hasarının göstergesi olarak görev yapar ve miyokard enfarktüsü ve iskemi-reperfüzyon hasarından kaynaklanan kas hasarı gibi durumların teşhisinde önemli bir rol oynar. (109)

2.6.4.5. Sodyum (Na) ve Potasyum (K)

Sodyum ve potasyum, hücresel homeostazın ve uygun fizyolojik işlevin sürdürülmesi için hayati önem taşıyan temel elektrolitlerdir. Bu iyonların hücre içi ve

hücre dışı konsantrasyonları arasındaki denge, membran potansiyelinin korunması, hücre sinyalizasyonu ve osmoregülasyon dahil olmak üzere çeşitli hücresel süreçleri korumak için sıkı bir şekilde düzenlenir.

İskemi sırasında, oksijen ve besin eksikliği hücresel enerji üretimini tehlikeye atarak Na^+/K^+ ATPaz pompası gibi iyon pompalarının işlevinde bozukluklara yol açar. Enerji tedarikindeki bu kesinti, pompanın Na^+ 'yı hücre dışına ve K^+ 'yı hücre içine aktif olarak taşıyamaması nedeniyle hücre içi sodyum iyonlarının birikmesine neden olur. Sonuç olarak, hücre içi sodyum seviyeleri yükselerek hücresel ödeme ve irileşmeye, membran depolarizasyonuna ve hücre hasarı ile ilişkili yolların aktivasyonuna katkıda bulunur. (110)

Reperfüzyonun ardından oksijenin aniden yeniden verilmesi, ROM oluşması ve inflamatuvar olayların başlaması yoluyla hücresel hasarı şiddetlendirir. Kan akışının yeniden sağlanması, hücrelere hızlı bir sodyum iyonu akışını tetikleyerek hücre içi Na^+ konsantrasyonlarını daha da yükseltir. Bu sodyum iyonu akışı, bozulmuş pompa fonksiyonu ve artmış membran geçirgenliği ile birleşerek hücresel ödemi yoğunlaştırır ve apoptotik ve nekrotik yolların başlamasına katkıda bulunur.(111)

Tersine, potasyum iyonları hücrelerin dinlenme membran potansiyelinin korunmasında çok önemli bir rol oynar. İskemi sırasında, Na^+/K^+ ATPaz pompasının bozulması ve hücre içi K^+ depolarının serbest kalması nedeniyle hücre içi potasyum seviyeleri artar. İskemiye takip eden reperfüzyon, potasyum iyonlarının hücrelerden dışarı atılmasıyla sonuçlanarak hücre dışı potasyum seviyelerinin yükselmesine katkıda bulunur. Serumda K seviyesinin artışı özellikle kardiyak ve nöral hasar başta olmak üzere sistemik her dokuda hasara yol açar.(108)

İskemi-reperfüzyon hasarı sırasında sodyum ve potasyum konsantrasyonlarındaki karmaşık değişiklikler, hücresel bütünlüğü ve işlevi önemli ölçüde etkileyerek sistemik hasara da sebep olur. Bu sebeple IRH'de bu iyonların değişimi sistemik etkilenmeyi gösterir.

3. GEREÇ VE YÖNTEMLER

Hacettepe Üniversitesi Tıp Fakültesi (H.Ü.T.F.) Deney Hayvanları Etik Kurulu'nun onayı (toplantı sayısı 2022/9, dosya kayıt no: 2022/58 karar numarası: 2022/09-03 sayı 52338575-130 tarih:25.10.2022) alınarak Hacettepe Üniversitesi Fizioloji Anabilim Dalı'nda çalışmaya ait deneysel yapılmıştır. Çalışmanın yürütülmesi amacıyla Hacettepe Üniversitesi Rektörlüğü Bilimsel Araştırma Projesi (B.A.P) Koordinasyon Müdürlüğü'nden (sayı: THD- 2023-20512) destek alındı.

Bu tez çalışmasında, Başkent Üniversitesi Deney Hayvanları Üretim ve Araştırma Merkezinden alınan Winstar Albino cinsi, 6-8 haftalık 20 adet erişkin (200-250 g) erkek sıçan kullanılmıştır. Tez çalışması planlanırken G-power programı kullanılarak iki ortalama arasındaki farkın anlamlılık testi için tek yönlü varyans analizi kullanarak $\alpha = 0,05$ anlamlılık ve $\beta = 0,80$ güç değeri ile örneklem genişliği hesaplanmış ve istatistiksel değerlendirmelerin yapılabilmesi için gereken en az hayvan sayısı her grup için 7 olarak belirlenmiştir. Cerrahi prosedürün zorluğu ve anestezi süresinin uzunluğuna bağlı olarak her grup için 2 hayvan kayıp ihtimali göz önüne alınarak toplam denek sayısı $n = 18$ belirlenmiştir. Hayvan deneylerinde sadece deney hayvanı kullanım sertifikasına sahip olan araştırmacılar görev almıştır. Deney protokolü ilgili yasal mevzuat ve ABD Ulusal Sağlık Enstitüsü (NIH) tarafından yayınlanan "Laboratuvar Hayvanlarının Bakımı ve Kullanımı Rehberi" (Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th Ed.) belirtilen kurallara göre hazırlanmış ve çalışma boyunca bu kurallara uygun davranılmıştır.

Deney hayvanları laboratuvara geldikten sonra 3 gün alıştırma süreci olarak 12 saat gece/12 saat gündüz döngüsünde uygun sıcaklıkla bekletilmiştir. Deney sırasında yakın monitarizasyon gerektiğinden tüm hayvanlar aynı anda laboratuvara getirilmemiştir. 18 sıçan randomize bir şekilde ikişer gruplara bölünmüş ve o şekilde laboratuvara getirilip bekletilmiştir. Her deney gününde 2 deney hayvanı için cerrahi planlanmıştır. Uygun laboratuvar yemi ve musluk suyu ile hayvanların beslenmeleri sağlanmıştır. Deney sırasında cerrahinin ve sonrasında elde edilecek sonuçlar etkilenmemesi açısından deneye katılacak araştırmacılar tarafından deney hayvanları günlük ziyaret edilmiş ve araştırmacılara alışmaları sağlanmıştır.

3.1. Gruplama

Soğukta saklama yöntemleri düşük hacimli dokularda iyi bir transport yöntemi gibi görülse de hacim büyüdükçe ve buna bağlı olarak metabolik ihtiyaç arttıkça yeterli bir yöntem olarak görülmemektedir. Ex-situ perfüzyon yöntemlerinin daha az iskemi-reperfüzyon hasarı oluşturduğu bilinmekte ve buna bağlı daha az sistemik inflamatuvar yanıt oluşturacağı varsayılmaktadır. Bu sebeple özellikle majör ekstremitte yaralanmaları, çoklu ekstremitte amputasyonları ve transplantasyonlarda soğukta saklama yöntemine alternatif olabileceği düşünülmektedir. Bu yöntemle beraber replante/transplante edilen dokunun sağkalımının artması, ameliyat sonrası iyileşme sürecinin olumlu etkilenmesi ve uzun dönemde fonksiyonel kazanımların artırılması amaçlanmaktadır. Bunu gösterebilmek için sıçanlarda arka ekstremitede amputasyon modeli oluşturulacak ve soğukta saklama ile ekstrakorporeal perfüzyon modeli kıyaslanacaktır. Bu sebeple 2 ayrı grup planlanmıştır.

Deney hayvanları yapılan analizlerle en az 7 hayvan her iki grupta olacak ve 2 deney hayvanlık da kayıp ihtimaline karşılık olarak 9'ar iki gruba ayrılmıştır. 4 deney hayvanı cerrahi sırasında erken dönemde (iskemi başladıktan 1 saat sonra) ölmüştür. Yapılan otopsilerde hayvanların akciğerlerinde beneklenme görüldüğünden çalışmaya dahil edilmemiştir. Daha sonra etik kurul izniyle tekrar 4 hayvan alınmıştır. Toplamda bu deney için 22 deney hayvanı kullanılmıştır. 1. grupta (Soğukta saklama grubu) bulunan deney hayvanlarından 1 tanesi deney sırasında öldüğünden toplam 17 hayvanın verisi ile çalışma sonuçlandırılmıştır. Daha sonra istatistiksel değerlendirme için her grupta 7 hayvan gerekli olacağından analizler her gruptan seçilen rastgele 7 hayvandan yapılmıştır.

3.2. Cerrahi İşlemler

Deney günü hayvanlar tartılıp 5 mg/kg ksilazin, 90 mg /kg ketamin kokteyli ile intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle anestezi altına alındı. Anestezi derinliği parmak sıkıştırma yöntemi ile kontrol edilip uygun anestezi derinliği sağlanınca cerrahiye başlandı. Deneyin 6 saat iskemi-1 saat reperfüzyon aşamaları olduğundan toplamda 7 saatten fazla süreceği göz önüne alınarak deney esnasında bıyık oynatma başlayınca idame doz olarak intraperitoneal enjeksiyon yöntemiyle deneyin ilk yarısında 2.5

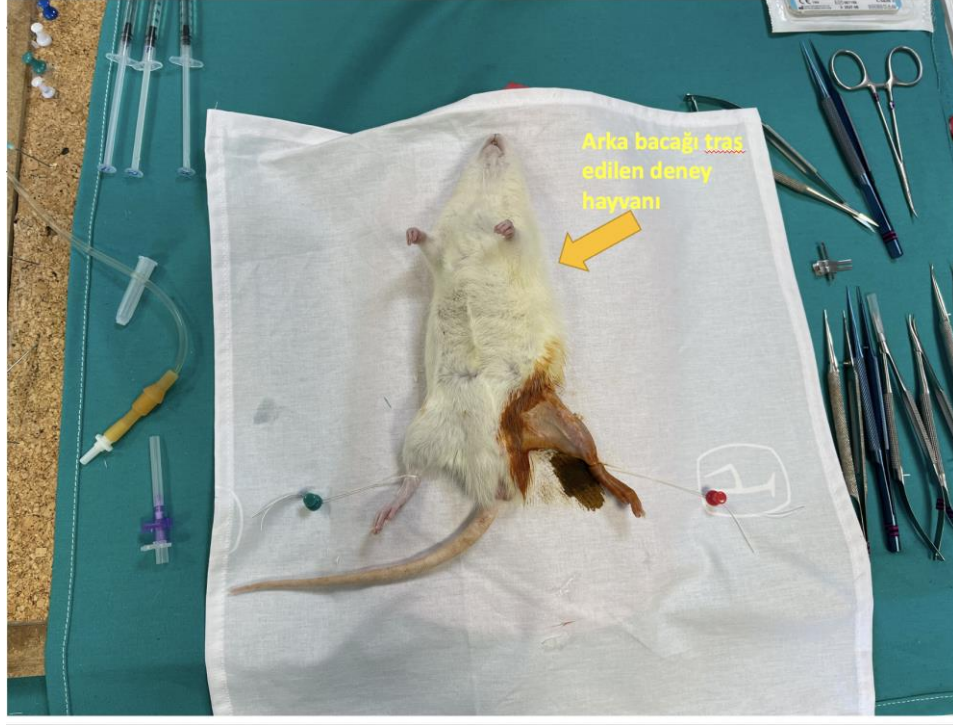
mg/kg ksilazin ve 50 mg /kg ketamin kokteyli, ikinci yarısında ise 1 mg/kg ksilazin ve 40 mg/ kg ketamin kokteyli uygulandı. Deney sürecinde böylece herhangi bir deney hayvanının acı çekmemesi sağlandı. Gözleri pomad ile korundu (Şekil 11).



Şekil 11. Deney hayvanlarının gözü pomad yardımıyla korundu.

Anestezi ardından sıçanların kuyruk veninden operasyon öncesi 1 cc standart kanları alındı. Sonrasında sıçanların alt karın ve bacak bölgesi tıraşlanarak batikon (Paviodine %10) ile sterilize edildi (Şekil 12). Tüm cerrahi boyunca deney hayvanının vücut sıcaklığı rektal prob ile takip edildi, sıcak su torbası ve ısıtıcı ampül yardımıyla termoregülasyonu sağlandı (Şekil 13) (Şekil 14). Vücut sıcaklığı 33°-36° olacak şekilde regülasyon sağlandı. Cerrahi tüm basamaklar loupe büyütme altında (3x büyütme) yapıldı. Bistüri yardımıyla sol bacağın en proksimalinden inguinal

ligamente paralel bir şekilde 3 cm'lik oblik insizyon ile deri üzerinde kesi oluşturuldu. Kanama kontrolü için cerrahinin tüm aşamalarında unipolar elektrokoter (The Hosty 2000 Loop Tip Cautery) kullanıldı (Şekil 15). Yağ dokusu ve fasialar dikkatlice ayrılarak femoral arter ve ven izole edildi (Şekil 16) (Şekil 17). (Her iki grup için anlatılan ilk basamaklar ortaktır).



Şekil 12. Traş edilen sıçan arka bacağı



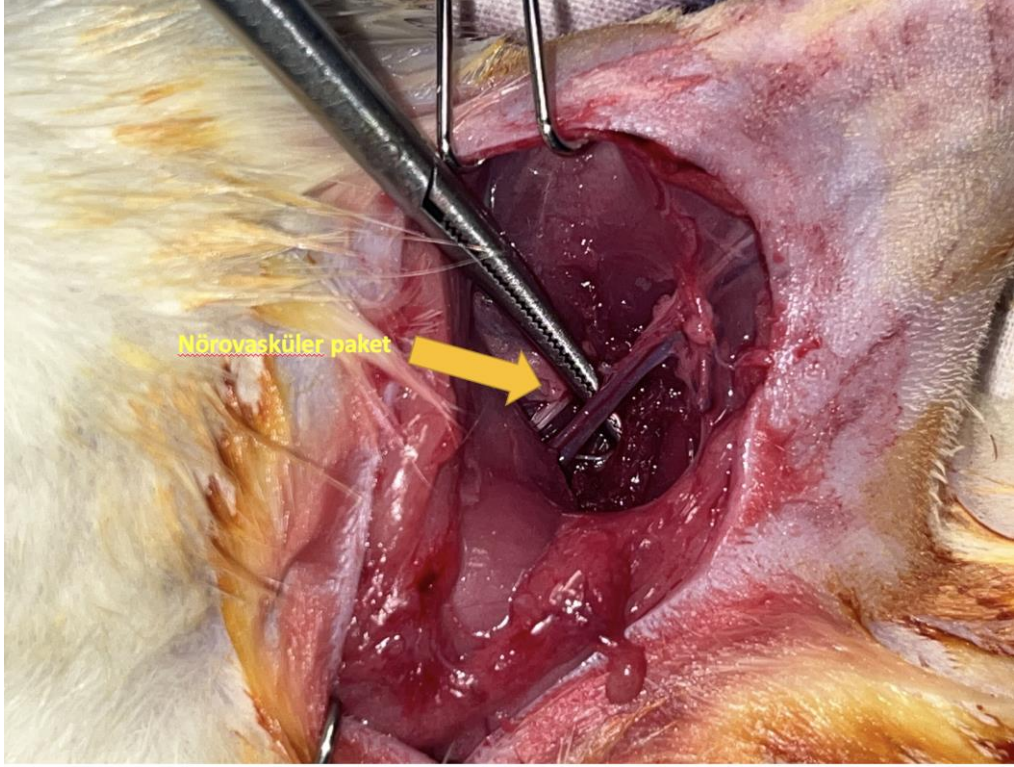
Şekil 13. Rektal prob yardımıyla sıcaklık kontrolü



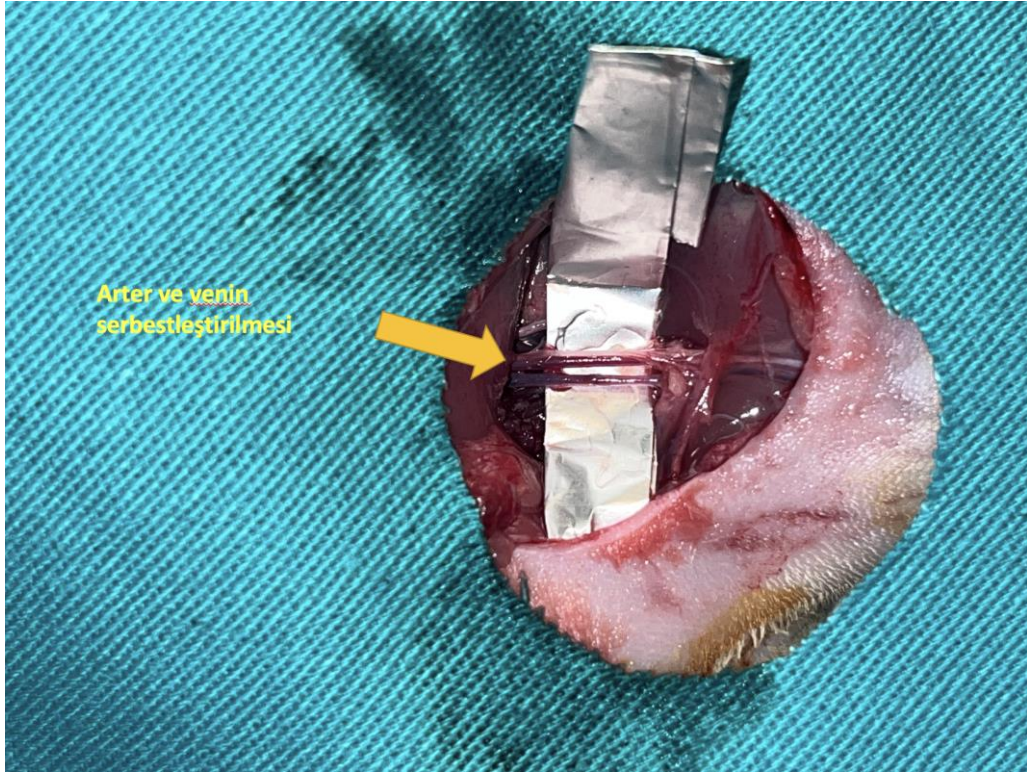
Şekil 14. Termoregülasyonu sağlamak amacıyla sıcak ısı kaynağı ile ısıtılan sıçan. Rektal probun bağlı olduğu termometre ile sıcaklık kontrol edilebilir.



Şekil 15. Unipolar lup uçlu koter.



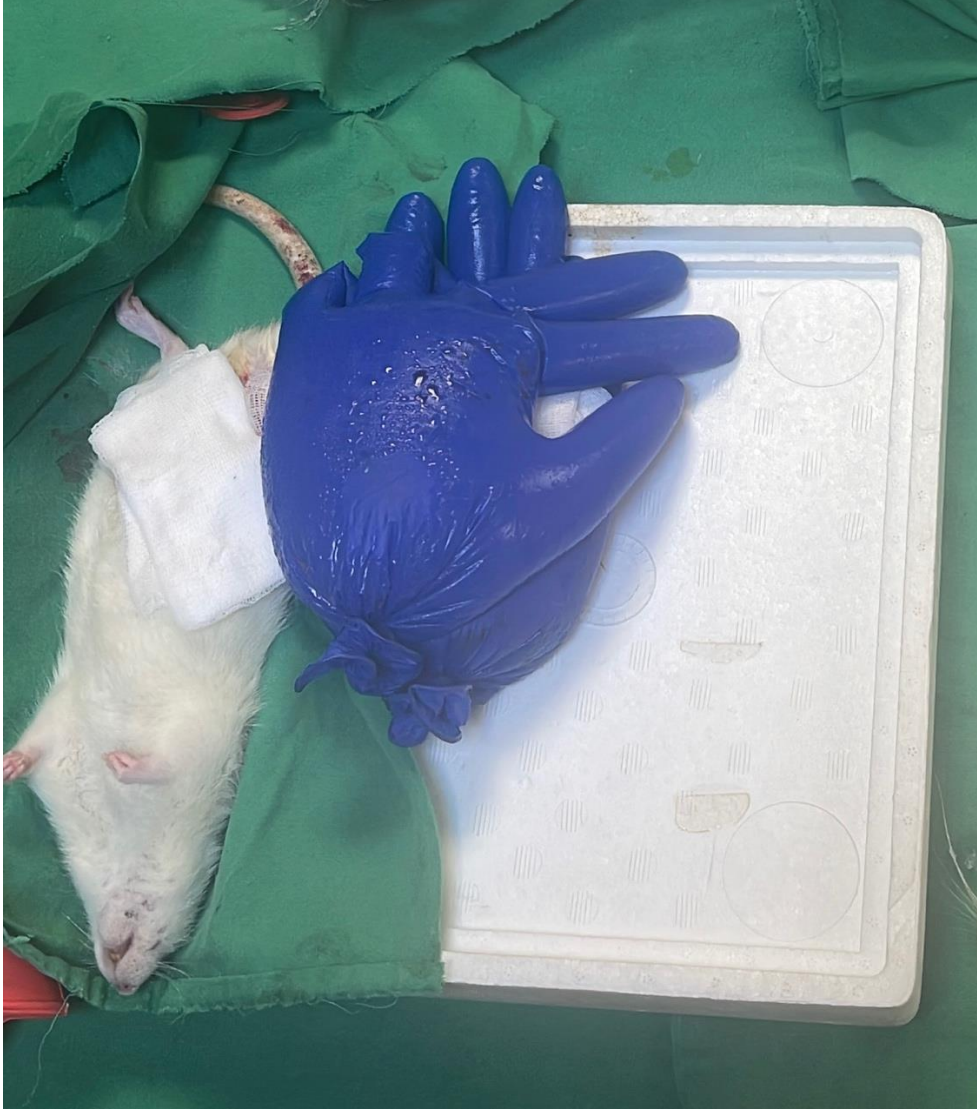
Şekil 16. Femoral arter ve venin olduğu nörövasqüler paket



Şekil 17. Femoral arter ve ven ayrı ayrı serbestleniyor.

3.2.1. Soğukta Saklama Grubu (Grup 1)

İzole edilen femoral arter ve ven inguinal ligamentin üst kısmından klemplenerek dolaşım sıçan sağ arka bacağında durduruldu ve femoral damarlar haricinde kemik dahil tüm dokuları içeren transfemoral amputasyon yapıldı. Klempin distalinde kalan amputat su geçirmez bir kılıfla sarılarak 6 saat buzlu su içerisinde soğuğa fiziksel temas etmeden bekletildi (Şekil 18). Deney hayvanının kalan gövdesi ısı yalıtımlı köpük yardımıyla ayrılıp ısıtıldı. İskemi başladıktan sonra anestezi derinliği, solunum hızı, bıyık oynatma, parmak sıkıştırma gibi yöntemlerle gözlemlendi. Bıyık oynatma durumlarında yukarıda belirtilen şekilde ek anestezi dozları yapıldı. İskemi süresi (6 saat) dolduktan sonra sıçana intraperitoneal yolla 2500 IU heparin yapıldı. Ardından ven ve arter üzerindeki klemler çıkartıldı, ekstremitelere reperfüzyonu sağlandı. Reperfüzyon damar üzerinde *milking* hareketi ile teyit edildi. Sıçan arka bacağı 1 saat boyunca reperfüze olduktan sonra transkütanöz yöntemle kalp üzerinden üzerinden girilip 2 cc kan alındı. Her aşamada kanama kontrolü unipolar koter yardımıyla sağlandı. Kanama ve buna bağlı komplikasyonlar minimize edildi. Deney hayvanının sıvı dengesini koruma amacıyla iskemi süresinde saatte 3 ml izotonik NaCl solüsyonu subkütan enjekte edildi.

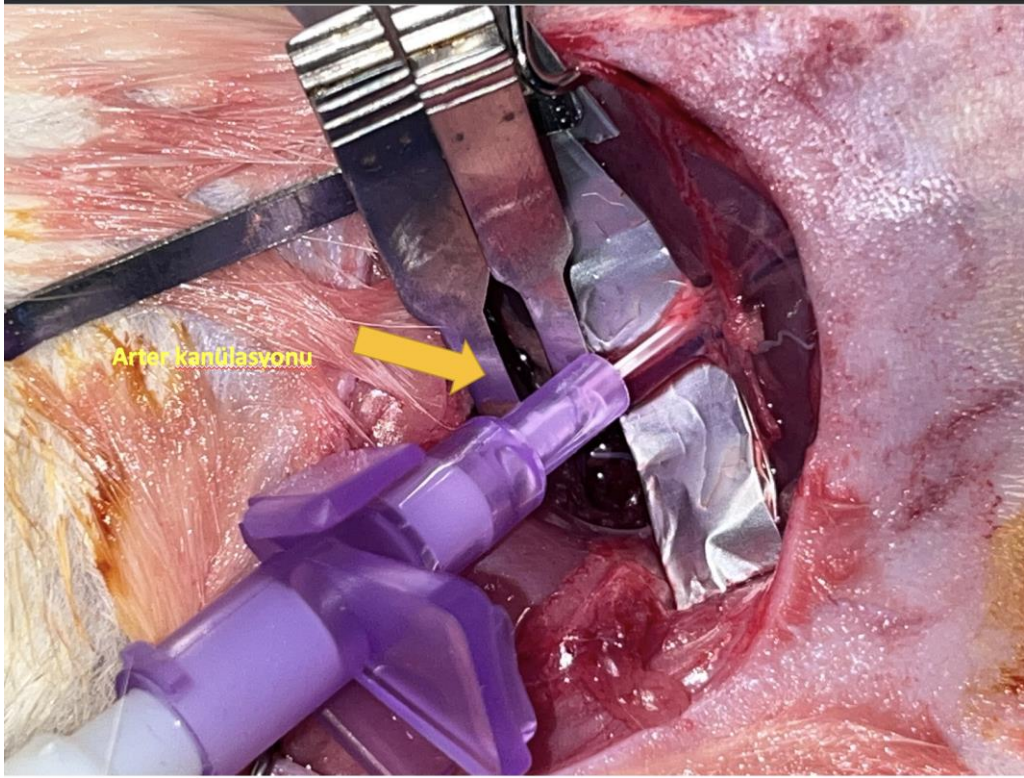


Şekil 18. Amputasyon modeli yapılan sıçan arka bacağı 2 adet buzlu su dolu eldiven arasında soğuğa fiziksel temas etmeden 6 saat iskemik bekletildi. Deney hayvanı üzerindeki cilt ile kaplı olmayan cerrahi alanlar nemli spanç yardımıyla kapatılarak ısı ve sıvı kaybı azaltılmaya çalışıldı.

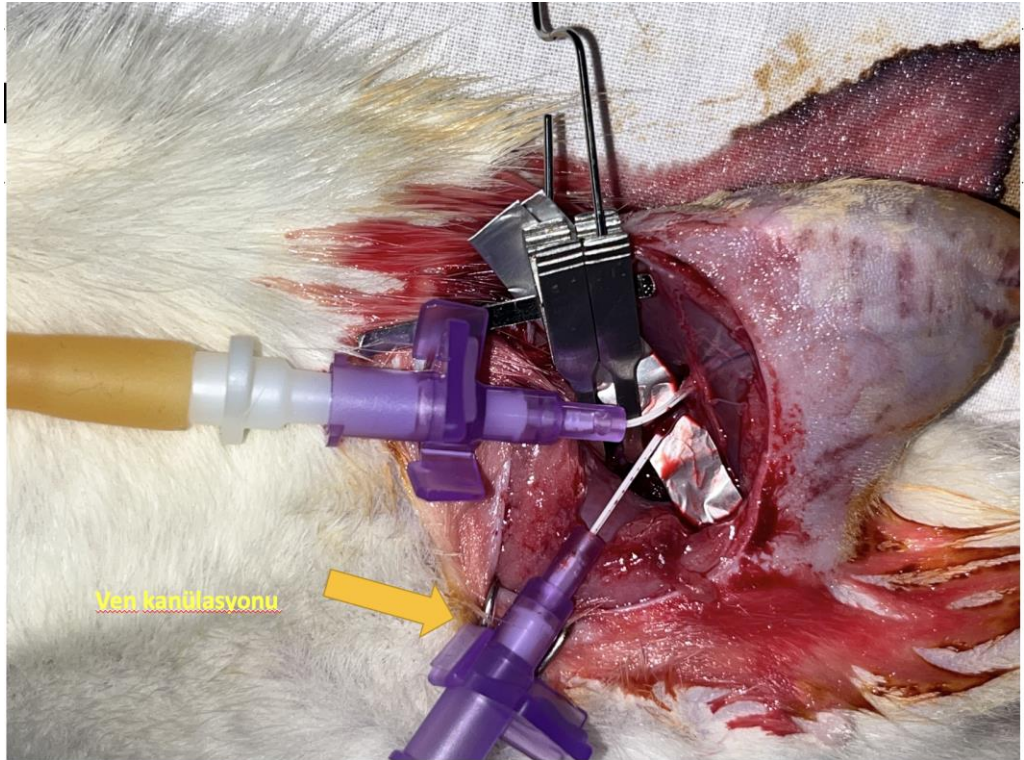
Kan alımı ardından torakal bölgeden 2 cm insizyon yapılarak kardiyak damarlar kesildi ve herhangi bir ağrı gözlenmeden ötenazi sağlandı. Hemen ardından sağ bacakta gastrokinemius kası diseke edildi. Gastrokinemius kasının lateral ve medial kısımları ayrı ayrı işaretlendi ve hızlı donma sağlamak amacıyla -80 nitrojen dolu kaptaki şok donduruldu. Ardından deney hayvanının sol bacağından da aynı şekilde gastrokinemius kası diseke edildi. Kasın lateral ve medial başları ayrı ayrı -80 derecede şok donduruldu. Ardından kalan her iki alt ekstremité histopatolojik inceleme için formol ile saklandı.

3.2.2. Ekstrakorporeal Dolaşım Grubu (Grup 2)

İzole edilen femoral arter ve ven klemlenerek dolaşım durduruldu ve femoral damarlar haricinde kemik dahil tüm dokuları içeren transfemoral amputasyon yapıldı. (Şekil 19) (Şekil 20). Femoral arter ve ven kanülle edildi. Kanülasyon ardından 3.0 ipek dikiş kullanarak kanül artere sabitlendi. Klempin distaline yerleştirilen 26 G kanülle (çap 0.6 mm) femoral arter perfüzyon sistemine bağlandı, femoral vene yerleştirilen kanül aracılığı ile sistemde dolaşan sıvının geri toplanması sağlandı. Deney sırasında uyanıklık durumu olup kanülasyonun zarar görmemesi için kanül sabitlendi (Şekil 21). Kanülasyondan sonra 1000 UI heparin ile femoral arterden yıkama sağlanıp ardından perfüzyon sıvısı bağlandı. Amputat osmotik basıncı korumaya yönelik olarak perfadex solüsyonu (İçeriğinde, her 1000 ml'de; % Dextran 40 (Mw 40000), 6 mmol K⁺, 0,8 mmol Mg⁺², 0,8 mmol H₂PO₄ ve H₂PO₄⁻², 5 mmol Glikoz bulunur) ile nihai solüsyon basıncı 2 ml/dk olacak şekilde kademeli olarak artırılarak bu değerde 6 saat perfüzyon sağlanacaktır. Perfüzyon sıvısına litresine 1 mg sulbaktam ve 0,5 mg ampisilin içeren antibiyotik ve 5000 IU heparin de eklendi. Perfüzyon sıvısı subnormotermik sıcaklıklarda korundu. Bu süre zarfında anestezi derinliği, solunum hızı, bıyık oynatma, parmak sıkıştırma gibi yöntemlerle gözlemlenecektir. İhtiyaç duyulması dahilinde yukarıda belirtilen dozlarda idame ek anestezi uygulandı. İskemi süresi (6 saat) dolduktan sonra perfüzyon sonlandırıldı, kanüller kapatıldı, ven ve arter üzerindeki klemler çıkartıldı, ekstremitte reperfüzyonu sağlandı. Kanülasyon yapılan femoral arter ve ven üzerindeki damarda oluşan deliklere 11.0 poliamid dikişle (Daylon) sütür konuldu ve oradan kan sızması engellendi. Reperfüzyon damar üzerinde *milking* hareketi ile teyit edildi. Sıçan arka bacağı 1 saat boyunca reperfüze olduktan sonra transkütanöz yöntemle kalp üzerinden üzerinden girilip 2 cc kan alındı. Her aşamada kanama kontrolü unipolar koter yardımıyla sağlandı. Kanama ve buna bağlı komplikasyonlar minimize edildi. Deney hayvanının sıvı dengesini koruma amacıyla iskemi süresinde saatte 3 ml izotonik NaCl solüsyonu subkütan enjekte edildi.



Şekil 19. Arterin proksimalindeki klemp ve distalinden kanülasyonu görülmektedir.



Şekil 20. Arter ardından ven kanülasyonu sağlanır.



Şekil 21. Kanül sabitleyici yardımıyla tutularak herhangi bir mobilizasyona karşılık önlem alındı.

Kan alımı ardından torakal bölgeden 2 cm insizyon yapılarak kardiyak damarlar kesildi ve herhangi bir ağrı gözlenmeden ötenazi sağlandı. Hemen ardından sağ bacakta gastrokinemius kası diseke edildi (Şekil 22). Gastrokinemius kasının lateral ve medial kısımları ayrı ayrı işaretlendi ve hızlı donma sağlamak amacıyla nitrojen dolu kapta şok donduruldu. Ardından deney hayvanının sol bacağından da aynı şekilde gastrokinemius kası diseke edildi. Kasın lateral ve medial başları ayrı ayrı -80 derecede şok donduruldu. Ardından kalan her iki alt ekstremitte histopatolojik inceleme için formol ile saklandı.



Şekil 22. Deney sonunda ampute edilen bacakta gastrokinemius kası izole ediliyor.

3.2.2.1. Perfadeks Solüsyonu İle Perfüzyon

Ekstremitte ve solid organ tranplantasyonlarında ana problemlerin başında IRH gelir. Bu sebeple başta akciğer tranplantasyonlarında kullanılan koruyucu solüsyonların başında Perfadeks (Vitrolife, Göteborg, Sweden) gelir. Perfadeks yüksek dextran içeren, potasyum ve magnezyum değerleri düşük bir solüsyondür. İçeriğinde bulunan glikoz sayesinde minimal bir metabolizma için enerji kaynağı sağlar. (112) Bazı çalışmalarda ekstremitte tranplantasyonlarında denenmiş ve başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Solüsyon modifikasyonlar ile kullanılabilir. (7) Bu çalışmada perfadeks solüsyonuna 1.5 gr sulbactam+ampisilin ve 5000 UI heparin eklemesi yapılmıştır. Ayrıca perfadeks solüsyonu 2 lt/dk'dan oksijenize edilerek kullanılmıştır. Perfadeks

solüsyonu Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi- Türkiye Doping Kontrolü Merkezi'nde bu çalışma için üretilmiştir.

Perfüzyon pompası olarak Volumat MC Agilia (Fresenius Kabi Else-Kröner-Strabe, Hamburg, Almanya) infüzyon pompası kullanıldı (Şekil 23) (Şekil 24). Pompa deneyin herhangi bir anında gerek kıvrılmasından gerekse herhangi bir tıkanıklığından kaynaklı perfüzyonda sorun oluştuğunda sesli uyarı verdiğiinden perfüzyon istenilen süre boyunca aksatılmadan sürdü. Perfüzyon basıncı dijital olarak ayarlanabildi.



Şekil 23. Perfüzyon pompası saatte 5 ml'ye kadar düşük miktarda sıvı verebileceği gibi saatte 240 ml'ye kadar çıkabilir.



Şekil 24. Aynı anda 2 deney hayvanı için kurulmuş olan cerrahi düzenek. Her hayvan için ayrı bir perfüzyon pompası kullanılarak 2 hayvan için perfüzyon sıvı miktarları arasında dengesizlik oluşturulmaması sağlanmıştır.

Deney hayvanı transfemoral ampute edilip femoral arter üzerinden kanülasyon sağlandıktan sonra perfüzyon pompası yardımıyla 0.1 ml/dk basınçla perfüze edilmeye başlandı. Her 15 dakikada sırasıyla 0.3 ml/dk, 0.5 ml/dk, 1ml/dk ve 2 ml/dk olarak kademeli bir şekilde perfüzyon basıncı artırıldı (Şekil 25). Perfüzyon sıvısı vene konulan kanül aracılığıyla, kesilen yapıların ve kasların üzerinden sızma yöntemiyle geri toplandı. Perfüzyon pompası ve kullanılan sistemde metabolitlere uzaklaştıracak diyaliz cihazı bulunmadığından kapalı sistem döngü olarak değil sürekli perfüzyon sıvısı eklenerek sistem devamlılığı sağlandı.



Şekil 25. Deney hayvanları perfüzyon sisteminde subnormotermik koşullarda perfüze oldu.

3.3. Doku Örnekleri ve Bakılacak Parametreler

Yapılan çalışmada deney öncesi alınan kan, deney sonrası alınan kan ve deney sonrası alınan kas ve cilt dokuları mevcuttur. Deney sonrasında yapılacak histopatolojik incelemeler Hacettepe Üniversitesi Pediatrik ve Perinatal Patoloji Bölümünde yapıldı. Diğer ELİSA ve Western Blot ile yapılacak olan analizler Hacettepe Üniversitesi Fizyoloji Anabilim Dalı laboratuvarında yapıldı. Deney hayvanlarından alınan kanlardan bakılacak biyokimyasal parametreler Hacettepe Üniversitesi Merkez Laboratuvarında bakıldı.

3.3.1 Protein Homojenizasyonu

Kas dokusu homojenizasyonu için. RIPA buffer kullanıldı. Homojenizasyon işlemi sırasında proteinlerin daha yüksek oranda saflaştırılması için proteaz inhibitör kompleksi kullanılmıştır.

3.3.2. Oksidatif Stres Parametreleri

Oksidatif hasarı belirlemek için total oksidan, total antioksidan, katalaz, superoksid dismutaz ve total tiol seviyelerinin ELİSA yöntemi ile bakılması belirlenmiştir.

Oksidatif hasar için bakılan parametreler cerrahi öncesi alınan kandan ve cerrahi sonrası ötenazi öncesi alınan kandan, amputasyon modeli oluşturulan bacadan alınan gastrokinemius kas homojenatından ve karşı sağlam bacadan alınan kas homojenatından bakıldı.

3.3.2.1. TAS/TOS Ölçümü

TAS ölçüm yöntemi örnekteki tüm antioksidan moleküllerin renkli ABTS kationik radikalini redüklemesi sonucu renkli radikal antioksidan moleküllerin toplam konsantrasyonlarıyla orantılı olarak dekolorize olması esasına dayanır.

TOS ölçümü ise örneklerin içerdiği oksidan moleküllerin ferroz iyonu ferrik iyonla kümülatif olarak oksitlemesine dayanan, kolorimetrik yöntemeye dayanır.

Organizma, serbest radikaller ve bunlara bağlı oluşan oksidatif stres ile mücadele eden kompleks bir antioksidan sisteme sahiptir. Kan, antioksidanların bütün vücuda taşınmasını ve dağıtılmasını sağlar. Total antioksidan duruma en büyük katkı plazmadaki antioksidan moleküllerden gelmektedir. Plazmada serbest demiri toplayan transferin ve seruloplazmin gibi proteinler yanında serbest radikalleri kapan zincir kırıcı antioksidanlar da bulunmaktadır. Endojen antioksidan moleküller enzimlerle beraber askorbik asit, ürik asit, glutatyon gibi moleküllerdir. Bununla beraber dolaşımda ekzojen kaynaklı tokoferoller, fenoller ve karotenler gibi bir çok antioksidan bileşik bulunur. (113)

Bu sebeple total antioksidan durumun ölçümü, antioksidanların tek tek ölçümünden daha değerli bilgiler verebilir. Aynı şekilde oksidanların kanda ROM ve diğer radikaller olarak ölçülmesi zordur. Bu sebeple total oksidan durumunun ölçülmesi daha doğru bilgi verir. İskemik kalan dokularda TAS ve TOS değerlerinin ölçümü kandan ziyade doku örneklerinden de çalışılabilir.

3.3.2.2. Katalaz, SOD ve Total Thiol Ölçümü

Oksidatif hasar sonrasında antioksidan sistem devreye girer. Hücre içinde ilk defansif mekanizmalardan birisi SOD enzimidir. Bu enzim süperoksit anyonlarının redüksiyonunda etkilidir. En güçlü antioksidan enzimidir. Özellikle süperoksitlerin lipid metabolizması sonrası oluşmasından ötürü lipid metabolizmasındaki antioksidan etkileri protein metabolizmasına göre daha fazladır.

Katalaz enzimi, SOD enzimine benzer şekilde reaksiyon gösterir. Hücre içerisinde peroksizom içerisinde bulunur. Mitokondride bulunan glutatyon peroksidaz enzimi ile benzer etkinliği vardır.

Thiol grubunda bulunan -SH yapısının oksidasyon için afinitesi yüksektir. Proteinlerin geri dönüşümsüz olarak yıkımı ile oluşan sistein rezidülerine karşı proteinlere korumak için oksidatif hasar ve benzeri durumlarda miktarı artar. Metabolik stres durumlarında protein oksidasyonu sebebiyle miktarı değişir.

Enzimatik olarak katalaz ve SOD aktivitesinin artışı hücresel olarak antioksidan mekanizmasının etkinliğini gösterir. Bu çalışmada bu sebeple antioksidan etkinliği ölçmek için kullanıldı. Total thiol miktarının artışı yine antioksidan mekanizmaların arttığını gösterdiğinden bu çalışmada kullanılmıştır.

3.3.3. Histopatolojik Parametreler

Her hayvanın ampute edilen bacağından ve sağlıklı bacağında 0.5x0.5x0.2 cm boyutlarında kas dokusu alınarak sıvı azot (-196 C) içerisine konarak frozen kesitler için örnekler toplandı ve -80 derece soğukta saklandı. Sonrasında doku örnekleri soğutmalı mikrotomda kesilerek kesitler elde edildi ve bu kesitler COX boyalarıyla boyanarak mitokondriyal hasar ve apoptoz parametreleri incelendi.

Hayvan bacağından alınan kas örneklerinden apoptoz markerleri olan bcl-2 ve bax proteinleri ELİSA yöntemiyle incelendi.

Hayvanların ampute bacağından ve sağlıklı karşı bacağından cilt örnekleri proksimal kısımdan ve distal kısımdan alındı. Rutin hematoksilen/eozin boyası ile boyanarak inflamasyon ve apoptoz açısından değerlendirildi.

3.3.3.1. bcl-2/bax Ölçümü

Apoptozun intrinsik ve ekstrinsik yolları vardır. Ekstreinsik yollar hücre dışı oluşan olaylar sonrasında hücreye gelen sinyaller tarafından koordine edilir. İntrinsik yolak ise mitokondriyal yoldur. Bu yolda temel proteinler bcl ailesidir. Mitokondri membranında bulunan bcl-2 anti-apoptotik bir proteindir. Membrana bağımlı olmayan bax, bad gibi proteinler ise pro-apoptotik proteinlerdir. Hücresel olarak bu proteinlerin dengesi apoptozu etkiler. Organizma stres ile karşı karşıya kaldığından bax proteini etkisiyle mitokondriyal geçirgenlik değişir. Buna bağlı olarak da apoptoz indüklenir.

Bu çalışmada bu sebeple bcl-2 miktarı ile bax miktarı ELİSA yöntemiyle değerlendirilmiştir.

3.3.4. İnflamasyon belirteçleri

Bu parametrelerin bakılacağı örnekler, cerrahi öncesi ve sonrası alınan kan örneklerinden, reperfüzyon sonrası ampute edilen bacadan ve cerrahi yapılmayan diğer bacadan alınan gastrokinemius kas homojenatından bakıldı.

Bu örneklerde IL-10 (anti-inflamatuvar), TNF- α ve NF-K β (inflamatuvar) değerlendirildi. Deney başlarken alınan kandan ve deney sonrası kalpten alınan yüksek hacimdeki kandan biyokimyasal parametrelere bakıldı. Biyokimyasal olarak Na, K, laktat, CK, Myoglobin ve LDH miktarına bakıldı.

3.4. İstatistiksel Değerlendirme

Tez çalışmasının planlama aşamasında G-power programı kullanılarak ortalamalar arasındaki farkın anlamlılık testi için tek yönlü varyans analizi kullanarak $\alpha = 0,05$ anlamlılık ve $\beta = 0,80$ güç değeri ile örneklem genişliği hesaplanmış ve istatistiksel değerlendirmelerin yapılabilmesi için gereken en az hayvan sayısı iki grup için $n = 14$ belirlenmiştir. Ardından cerrahinin zorluğu ve anestezi süresinin uzunluğundan ötürü her gruba 2 deney hayvanı daha dahil edilmiştir.

Kantitatif verilerin istatistiksel analizi ve grafik çizimleri IBM SPSS Statistics 23 programı kullanılarak gerçekleştirildi. Veri setlerinin normal dağılıp dağılmadığının

belirlenmesi amacıyla Kolmogorov-Smirnov testi kullanıldı. Normal dağılım göstermediği belirlenen veriler gruplar arası karşılaştırmalar için Mann-Whitney U testi kullanıldı. Tekrarlı ölçümlerin incelenmesi amacıyla Wilcoxon testi kullanıldı. Tanımlayıcı istatistikler için median, çeyrekler arası genişlik verileri tablolarda gösterildi. İstatistiksel anlamlılık düzeyi $p < 0,05$ olarak belirlendi.

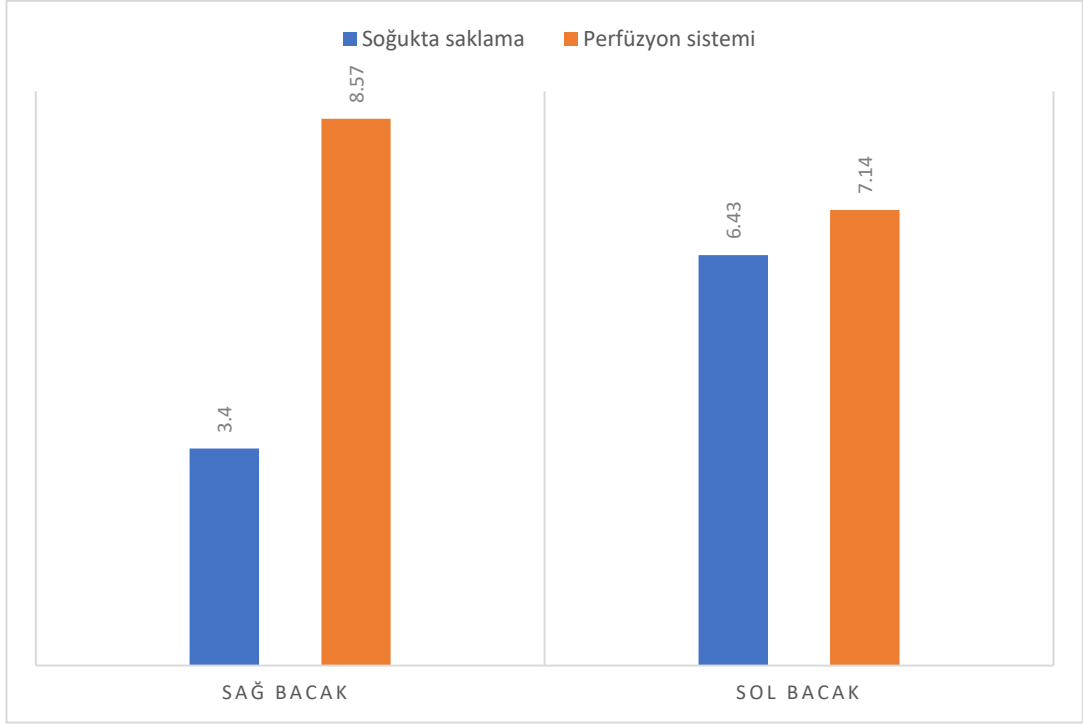
4. BULGULAR

4.1. Oksidatif Stres Parametreleri

4.1.1. TAS Ölçümü

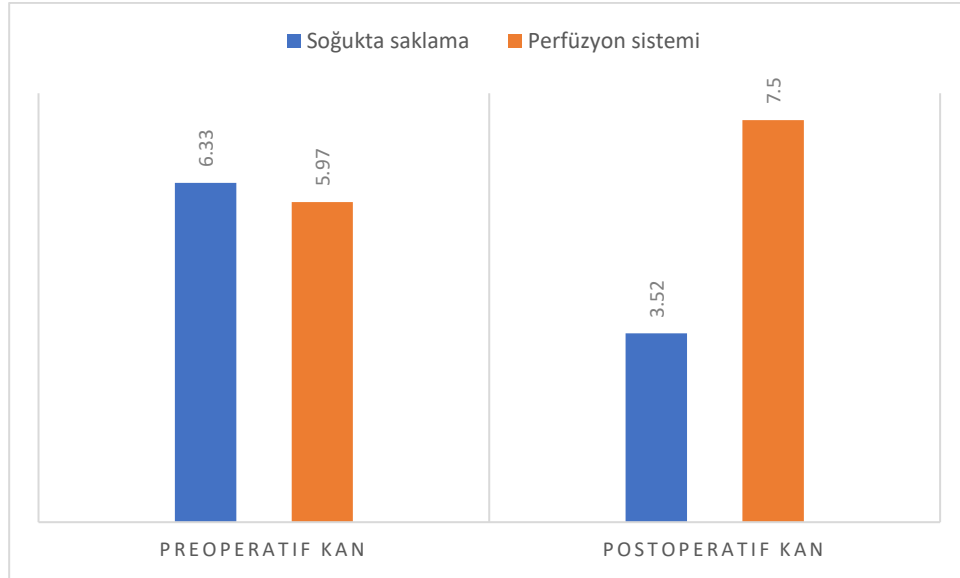
Total antioksidan miktarını belirlemek için hem kan hem de sıçan arka bacağından elde edilen gastrokinemius kasının medial kısmı kullanıldı. TAS değeri ELİSA yöntemi kullanılarak mmol Trolox equiv. /L şeklinde değerlendirildi.

Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ baktan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde TAS değeri ortalaması 3.4 mmol Trolox equiv. /L iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde TAS değeri ortalaması 8.57 mmol Trolox equiv. /L olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacakta (Sol bacak) TAS değeri 6.43 mmol Trolox equiv. /L ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 7.14 mmol Trolox equiv./L olarak gözlendi. Gruplara bakıldığında kontrol bacaklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, iskemi/reperfüzyon modeli yapılan bacakta TAS değeri perfüzyon sistemi kullanılarak saklanan grupta soğukta saklama grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yükseldi ($p<0.05$)



Grafik 1. Kas homojenatlarında TAS ölçümü

Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde TAS değeri soğukta saklama grubunda 6.33 mmol Trolox equiv. /L, perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 5.97 mmol Trolox equiv./L olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda TAS değeri soğukta saklama grubunda 3.52 mmol Trolox equiv. /L iken perfüzyon grubunda 7.5 mmol Trolox equiv./L olarak bulundu. Perfüzyon sisteminde cerrahi sonrasında TAS değerinde perfüzyon sonrasında kanda TAS değerinde artış gözlenirse de istatistiksel olarak fark gözlenmedi. Ancak soğukta saklama yapılan grupta TAS değeri istatistiksel olarak anlamlı şekilde düşük gözlendi ($p < 0.05$).

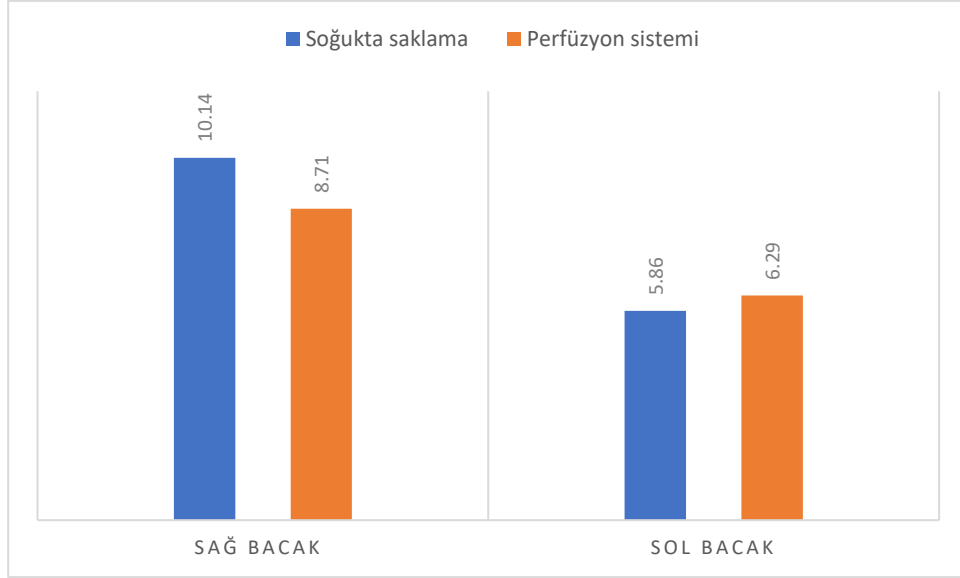


Grafik 2. Kan örneklerinde TAS ölçümü

4.1.2. TOS Ölçümü

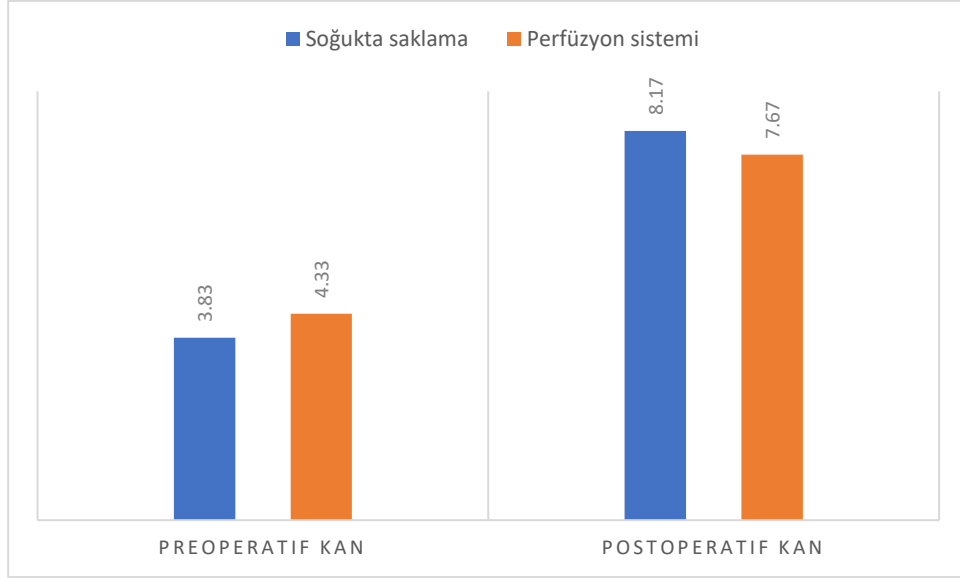
Total oksidan miktarını belirlemek için hem kan hem de sıçan arka bacağından elde edilen gastrokinemius kasının medial kısmı kullanıldı. TOS değeri ELİSA yöntemi kullanılarak $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{equiv/gr}$ şeklinde değerlendirildi.

Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacadan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde TOS değeri ortalaması $10.14 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{equiv/gr}$ iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde TOS değeri ortalaması $8.71 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{equiv/gr}$ olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacakta (Sol bacak) TOS değeri $5.86 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{equiv/gr}$ ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta $6.29 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2\text{equiv/gr}$ olarak gözlemlendi. Hem perfüzyon grubunda hem de soğukta saklama grubunda iskemi/reperfüzyon modeli yapılan sağ bacakta bacağına göre TOS değeri daha yüksektir. Perfüzyon sistemi ile saklama yapılan grupta soğukta saklama grubuna göre TOS değeri daha düşüktü.



Grafik 3. Kas homojenatlarında TOS ölçümü

Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde TOS değeri soğukta saklama grubunda 3.83 µmol H₂O₂equiv/L, perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 4.33 µmol H₂O₂equiv/L olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda TOS değeri soğukta saklama grubunda 8.17 µmol H₂O₂equiv/L iken perfüzyon grubunda 7.67 µmol H₂O₂equiv/L olarak bulundu. Hem perfüzyon sisteminde hem de soğukta saklama grubunda TOS miktarı cerrahi öncesine göre cerrahi sonrasında daha fazla artış göstermiştir.

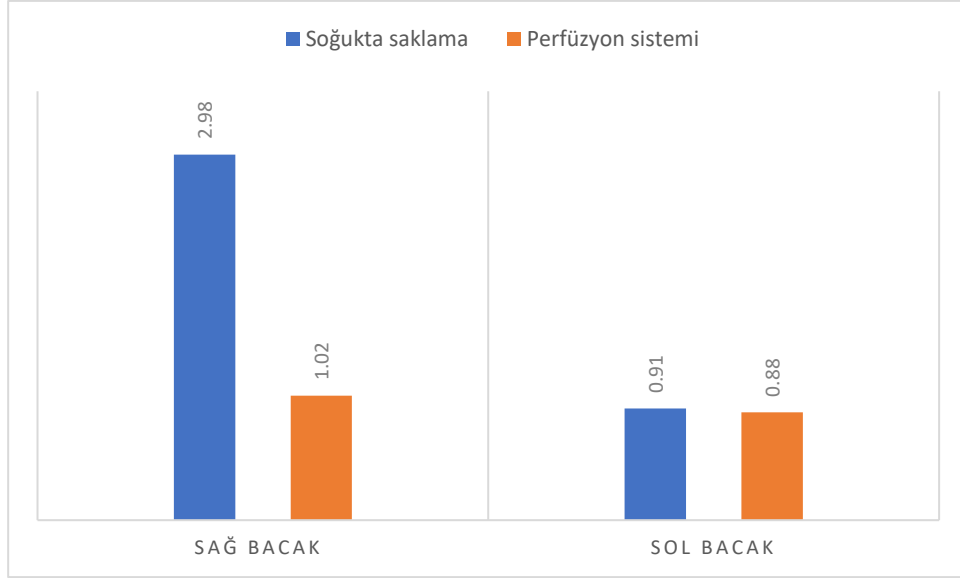


Grafik 4. Kan örneklerinde TOS ölçümü

4.1.3. OSI Değeri

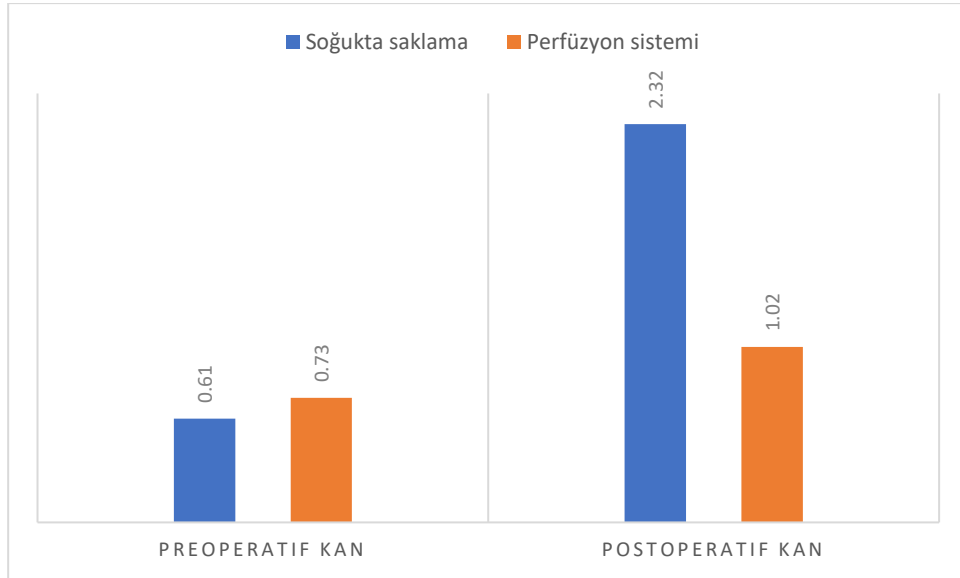
Oksidatif stres indeksi (OSI), ölçümler sonrasında alınan TOS değerlerinin TAS değerlerine oranı olarak belirlenir. Bu çalışmada kas ve kan değerleri için OSI değerleri hesaplanmıştır.

Kas örneklerinden ölçülen OSI değeri sağ bacakta soğukta saklama grubunda 2.98 iken, perfüzyon grubunda 1.02 olarak ölçülmüştür. Kontrol bacakta OSI soğukta saklama grubunda 0.91 iken, perfüzyon grubunda 0.88 olarak ölçülmüştür. OSI değeri iskemi reperfüzyon modelinde soğukta saklama grubunda perfüzyon grubuna göre anlamlı olarak yüksektir.



Grafik 5. Kas homojenatında OSI değeri

Kan örneklerinden ölçülen OSI değeri preoperatif kanlarda soğukta saklama grubunda 0.61 iken, perfüzyon grubunda 0.73 olarak ölçülmüştür. Postoperatif kanlarda OSI soğukta saklama grubunda 2.32 iken, perfüzyon grubunda 1.02 olarak ölçülmüştür. OSI değeri iskemi reperfüzyon modelinde soğukta saklama grubunda perfüzyon grubuna göre anlamlı olarak yüksektir.

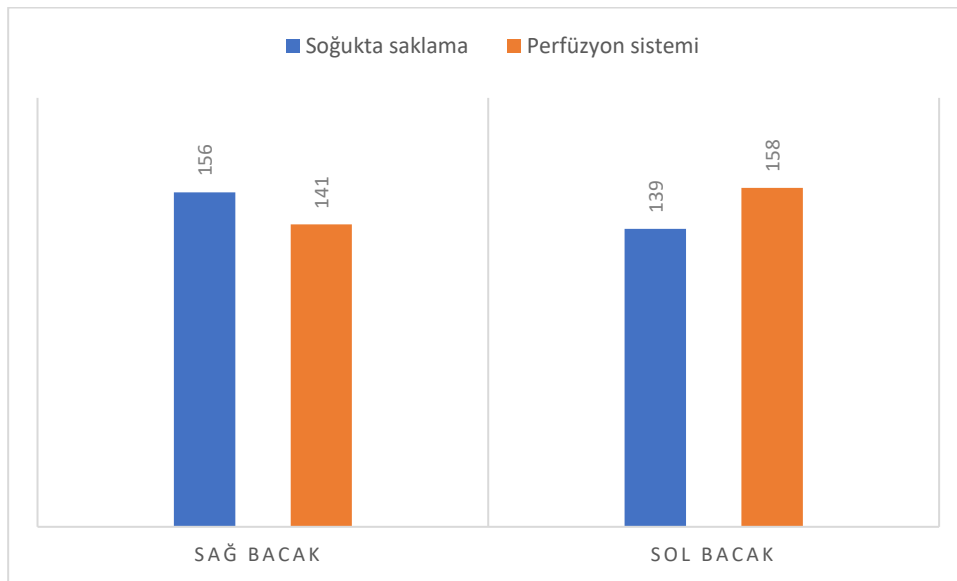


Grafik 6. Kan örneklerinde OSI ölçümü

4.1.4. Katalaz Ölçümü

Özellikle lipid peroksidasyonu sonrasında oluşan oksidatif ürünlere karşı organizmada katalaz enzim aktivasyonu artar. Bu çalışmada katalaz miktarı ELİSA yöntemi ile kas dokusu homojenatında ölçülmüştür.

Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacedan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde katalaz değeri ortalaması 156 U/mg protein iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde katalaz değeri ortalaması 141 U/mg protein olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol baceda (Sol bacak) katalaz değeri 139 U/mg protein ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 158 U/mg protein olarak gözlemlendi. Gruplar arasında katalaz değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi.

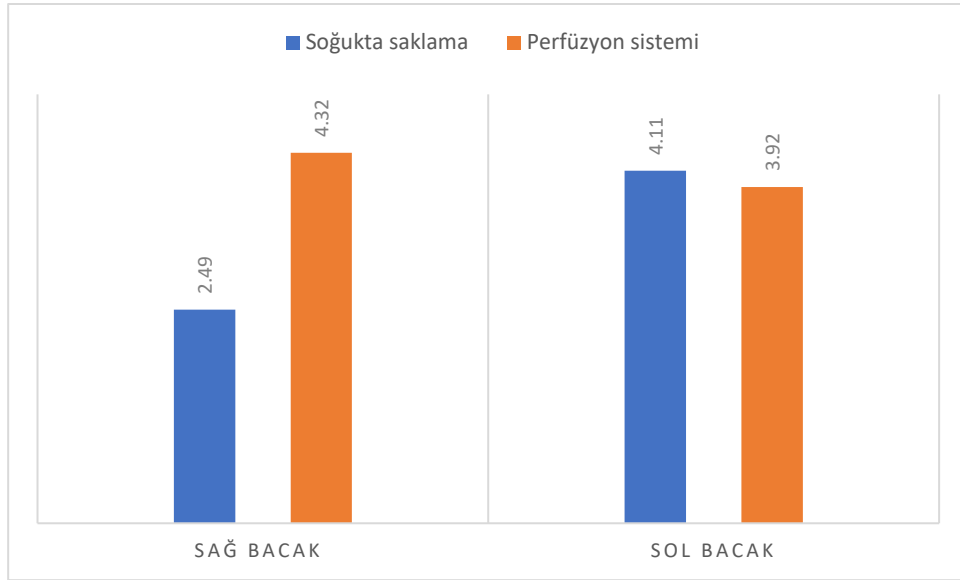


Grafik 7. Kas homojenatlarında katalaz ölçümü

4.1.5. SOD Ölçümü

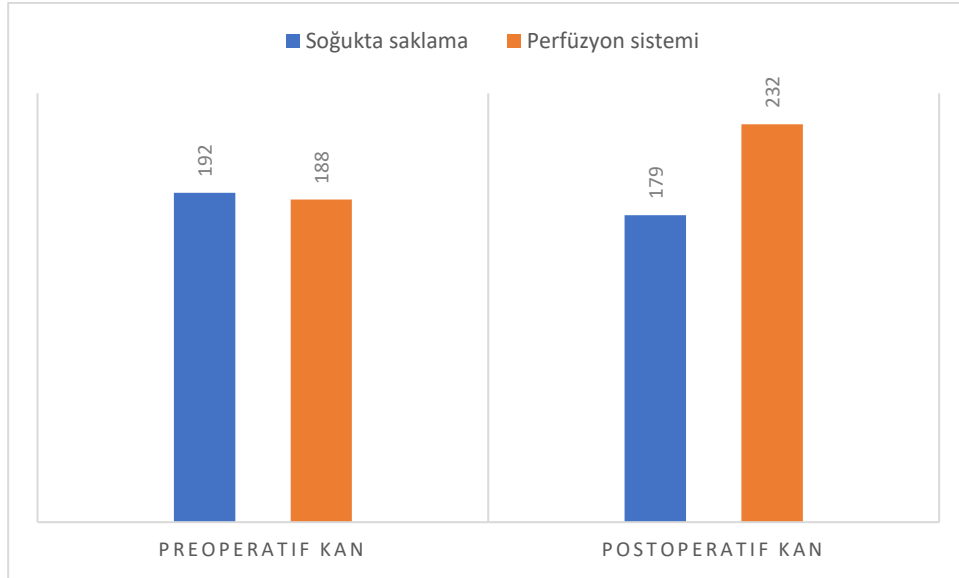
Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacedan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde SOD değeri ortalaması 2.49 U/mg protein iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde SOD değeri ortalaması 4.32 U/mg protein olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol baceda (Sol bacak) SOD değeri 4.11

U/mg protein ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 3.92 U/mg protein olarak gözlemlendi. Gruplara bakıldığında kontrol bacaklar arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yokken, iskemi/reperfüzyon modeli yapılan bacakta SOD değeri perfüzyon sistemi kullanılarak saklanan grupta soğukta saklama grubuna göre istatistiksel olarak anlamlı şekilde yüksekti ($p<0.05$).



Grafik 8. Kas homojenatlarında SOD ölçümü

Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde SOD değeri soğukta saklama grubunda 192 U/mL, perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 188 U/mL olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda SOD değeri soğukta saklama grubunda 179 U/mL iken perfüzyon grubunda 232 U/mL olarak bulundu. Perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan transplantasyon modelinde soğukta saklama modeline göre SOD değerinde artış görüldü.

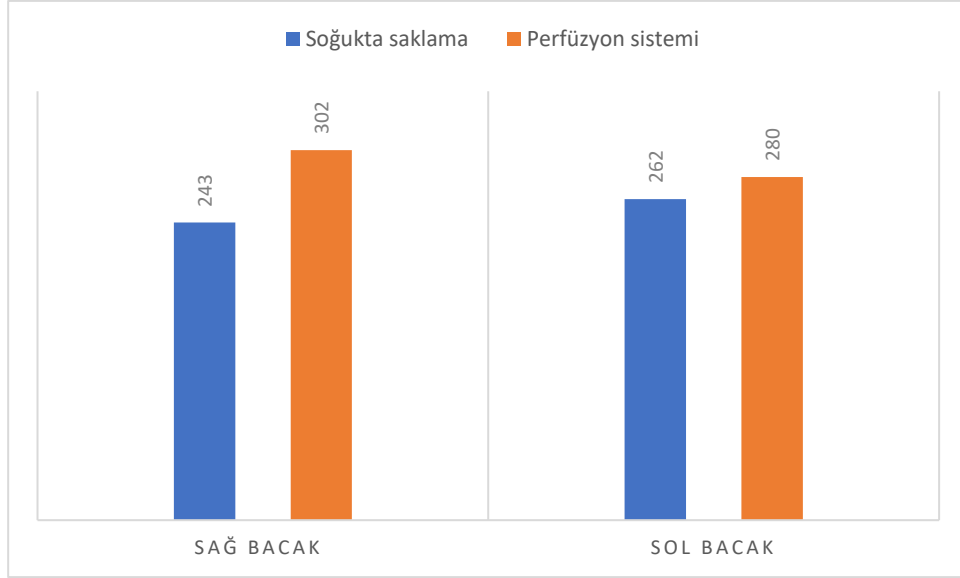


Grafik 9. Kan örneklerinde SOD ölçümü

4.1.6. Total Thiol Ölçümü

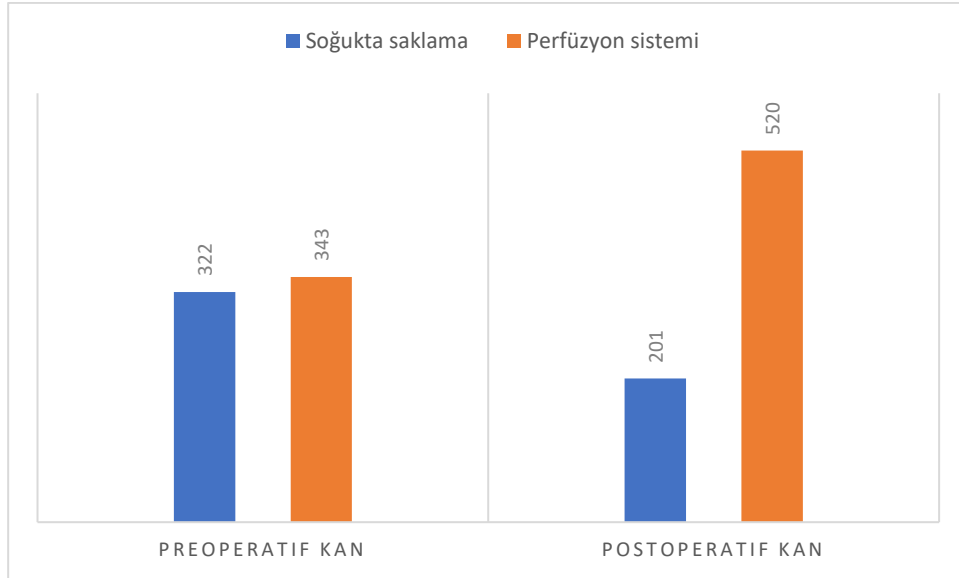
Özellikle protein yıkım ürünleri tarafından oluşturulan oksidatif ürünlere karşı organizmada thiol/sülfidril dengesi değişir. Bu çalışmada total thiol miktarı ELİSA yöntemi ile kas dokusu homojenatında ve serumda ölçülmüştür.

Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacadan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde total thiol değeri ortalaması 243 iken U/g protein, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde total thiol değeri ortalaması 302 U/g protein olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacakta (Sol bacak) total thiol değeri 262 U/g protein ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 280 U/g protein olarak gözlemlendi. Gruplar arasında total thiol değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlenmedi ancak perfüzyon sisteminde bekletilen grupta total thiol değerleri daha yüksekti.



Grafik 10. Kas homojenatlarında total tiol ölçümü

Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde total tiol değeri soğukta saklama grubunda 322 U/L, perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 343 U/L olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda total tiol değeri soğukta saklama grubunda 201 U/L iken perfüzyon grubunda 520 U/L olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda iskemi/reperfüzyon sonunda total tiol değerinde azalma görüldü. Perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan transplantasyon modelinde soğukta saklama modeline göre total tiol değerinde istatistiksel olarak anlamlı bir artış gözlemlendi ($p < 0.05$).

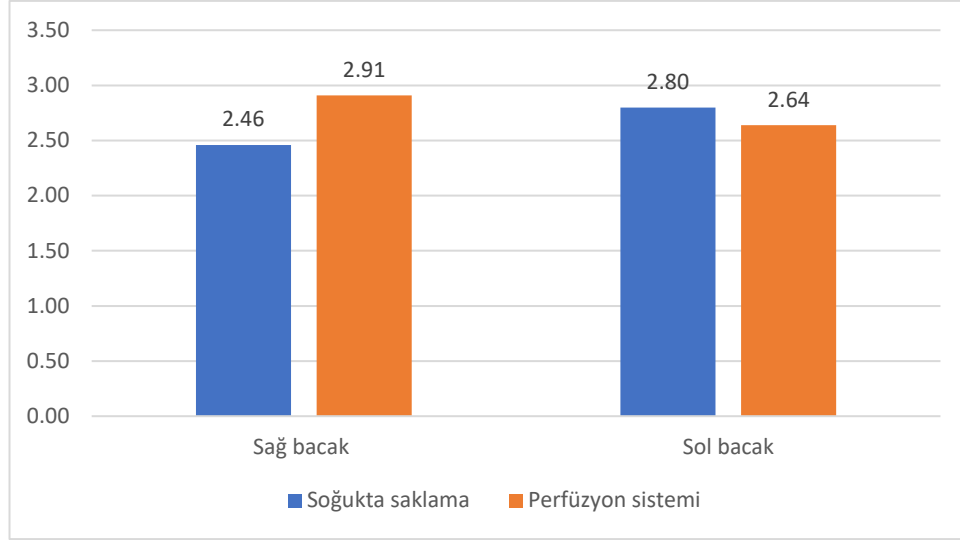


Grafik 11. Kan örneklerinde total tiol ölçümü

4.2. Apoptotik Parametreler

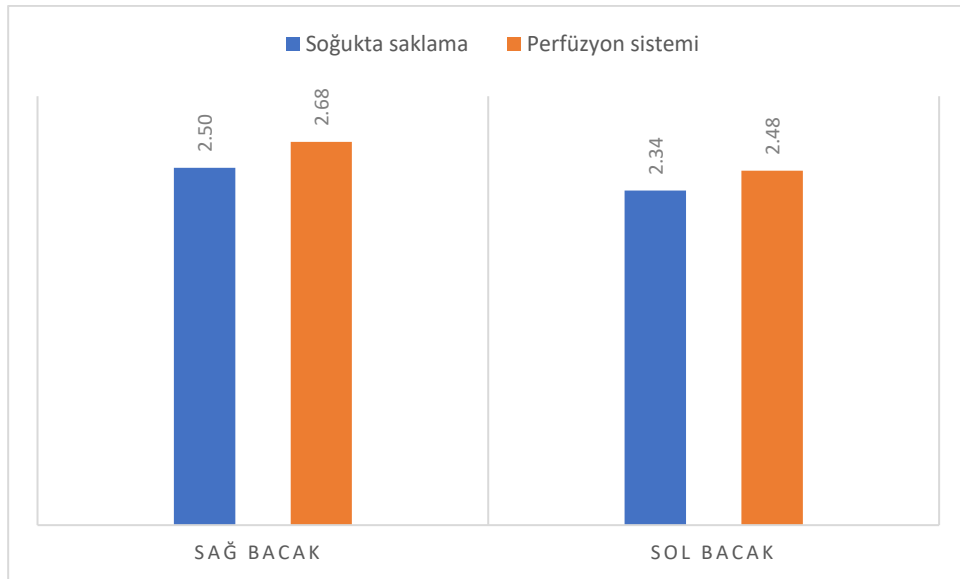
4.2.1. bcl-2/bax Ölçümü

Apoptoz sürecinde pro-apoptotik ve anti-apoptotik proteinlerin dengesi oldukça önemlidir. Bu çalışmada da amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacdktan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde bcl-2 değeri ortalaması 2.46 ng/mg iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde bcl-2 değeri ortalaması 2.91 ng/mg olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacadta (Sol bacak) bcl-2 değeri 2.80 ng/mg ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 2.64 ng/mg olarak gözlemlendi. Gruplar arasında bcl-2 değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi.



Grafik 12. Kas homojenatlarında bcl-2 ölçümü

Amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacdaktan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde bax değeri ortalaması 2.50 ng/mg iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde bax değeri ortalaması 2.68 ng/mg olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacadta (Sol bacak) bax değeri 2.34 ng/mg ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 2.48 ng/mg olarak gözlemlendi. Gruplar arasında bax değeri açısından istatistiksel olarak anlamlı bir fark gözlemlenmedi.



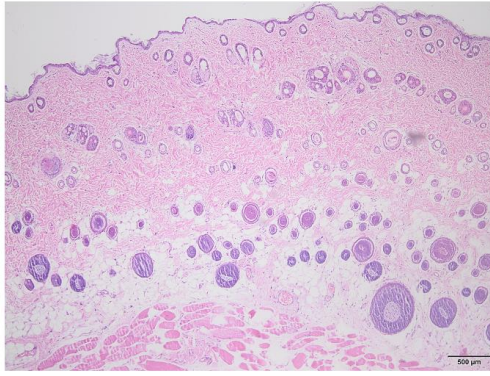
Grafik 13. Kas homojenatlarında bax ölçümü

4.3. Histopatolojik Parametreler

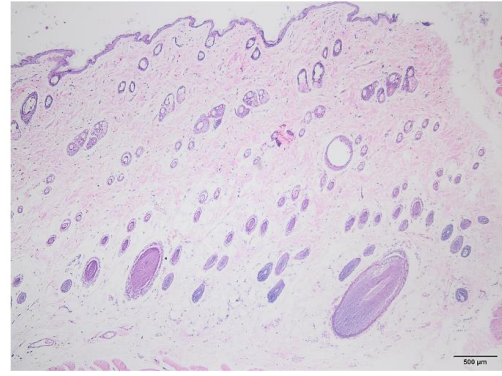
4.3.1. Cilt ve Sinire Ait Değişiklikler

6 saatlik iskemi ve 1 saatlik reperfüzyonun ardından hem soğukta saklama grubunda hem de perfüzyon sistemi grubunda deney bacağı (sağ bacak) ve kontrol bacak (sol bacak) bacak transfemoral olarak ampute edilip formol ile fikse edildi. Ardından proksimal ve distal sıra olmak üzere her bacakta 2 ayrı kesit incelendi.

Toplam 7 saatlik cerrahi sonrasında hem soğukta saklama grubunda hem de perfüzyon grubunda kontrol bacak ve deney bacağına hemotoksilen/eozin ile boyama sonrasında cilt ve sinir dokuda herhangi bir farklılık gözlenmedi. (Şekil 26)



Soğuk grubu



Perfüzyon grubu

Şekil 26. Cilt ve cilt altı dokuda soğukta saklama grubu ve perfüzyon grubunun histopatolojik olarak 20x büyütmede görüntüsü

4.3.2. Kas Dokusuna Ait Histopatolojik Değişiklikler

Hem soğukta saklama grubunda hem de perfüzyon sistemi grubunda deney hayvanının arka bacağından gastrokinemius kasının lateral başı -196 °C sıvı azotta ani dondurulduktan sonra -80 °C'de saklandı. Daha sonra alınan örnekler Hematoksilen/Eozin ve COX boyaması yöntemleri ile incelendi. Hematoksilen/Eosin boyalı preparatlar lif hasarı (eozinofilik boyanma /çizgilenme kaybı /sarkoplazmik bozulma), rejenere lif, interstisyumda ödem, inflamatuvar hücre infiltrasyonu, konjesyon-ekstravazasyon ve fibrozis açısından; COX boyalı preparatlar iri mitokondri varlığı, mitokondriyal dağılımda bozulma (subsarkolemmal dağılım) ve COX eksikliği (soluk / negatif boyanma) açısından değerlendirilerek skorlandı.

(0: yok; 1: fokal/hafif; 2: orta; 3: yaygın/şiddetli).

Tablo 4. Dokuda konjesyon, fibrozis, rejeneratif lif ve cox eksikliği hiçbir örnekte görülmedi. Diğer örneklerde görülen değişimlerin kaç örnekte ve hangi skorda görüldüğü tabloda gösterilmiştir.

Histopatolojik Bulgu	Skor	Soğukta Saklama-Sağ	Soğukta Saklama-Sol	Perfüzyon Sistemi-Sağ	Perfüzyon Sistemi-Sol
Lif Hasarı	0	2	2	4	4
	1	5	5	3	3
	2				
	3				
Doku Ödemi	0				
	1	5	5	2	6
	2	2	2	2	1
	3			3	
Perivasküler inflamatuvar hücre infiltrasyonu	0	3	6	4	5
	1	3	1	3	2
	2	1			
	3				
H/E Boyamada mitokondriyal belirginleşme	0	3	4	5	4
	1	1	2	2	3
	2	2	1		
	3	1			
COX boyamasında irileşmiş mitokondriler	0		3	4	2
	1	4	4	3	4
	2	3			1
	3				
COX boyasında subsarkolemmal mitokondriler	0	1	3	5	2
	1	1	3	2	5
	2	5	1		
	3				

Rejenere lifler, dokuda fibrozis, interstisyel ekstrasvazyon/konjesyon ve cox eksikligi herhangi bir grupta görülmemiştir.

Kas liflerinde görülen mikroskobik hasara bakıldığında soğukta saklama grubunda perfüzyon grubuna göre daha fazla sayıda örnekte kas lifi hasarı vardır. Görülen kas lifi hasarı tüm örneklerde hafif şiddettedir.

Dokuda ödemlenme özellikle perfüzyon sistemi amputasyon modelinde fazlayken; soğukta saklama grubunda amputasyon modelinde ve her iki grubun kontrol bacağında fark görülmemiştir.

Perivasküler hücre infiltrasyonu özellikle her iki grupta da amputasyon modelinde kontrol bacağına göre daha fazla görülmüştür.

Hemotoksilen/Eozin boyaması sonrasında mitokondriyal belirginleşme özellikle soğukta saklama grubunda amputasyon modelinde daha fazla görülürken diğer gruplarda bazı örneklerde hafif mitokondriyal belirginleşme görülmüştür.

COX boyaması sonrasında mitokondriyal irileşme özellikle soğukta saklama grubunda amputasyon modelinde daha fazla görülürken diğer gruplarda bazı örneklerde hafif görülmüştür.

COX boyaması sonrasında mitokondrilerin merkezden perifere doğru göç etmesi (subsarkolemmal yer değişimi) soğukta saklama grubunda amputasyon modelinde daha fazla görülürken, perfüzyon sisteminde amputasyon modelinde sadece 2 örnekte hafif olarak görülmüştür.

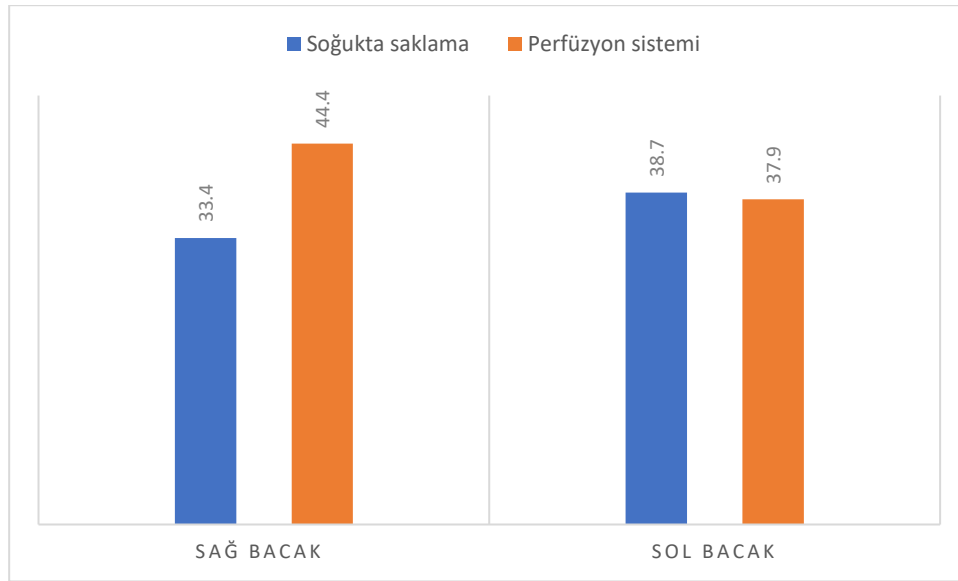
4.4. İnflamatuvar Değişiklikler

İnflamasyonu değerlendirme için pro-inflamatuvar TNF- α ve NF-K β ELISA yöntemi ile görüldü. Anti-inflamatuvar sitokin düzeyi için IL-10 değeri görüldü.

4.4.1. IL-10 Ölçümü

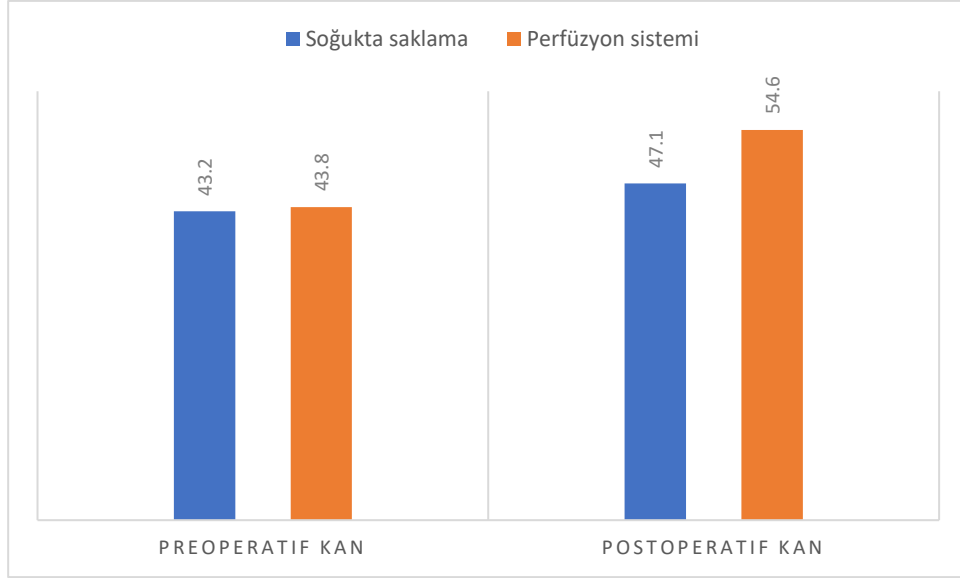
Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacadan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde

IL-10 değeri ortalaması 33.4 ng/mg protein iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde IL-10 değeri ortalaması 44.4 ng/mg protein olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacakta (Sol bacak) IL-10 değeri 38.7 ng/mg protein ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 37.9 ng/mg protein olarak gözlendi. Soğukta saklama yöntemi ile doku saklama yönteminde perfüzyon grubuna göre IL-10 miktarı daha düşüktü.



Grafik 14. Kas homojenatlarında IL-10 ölçümü

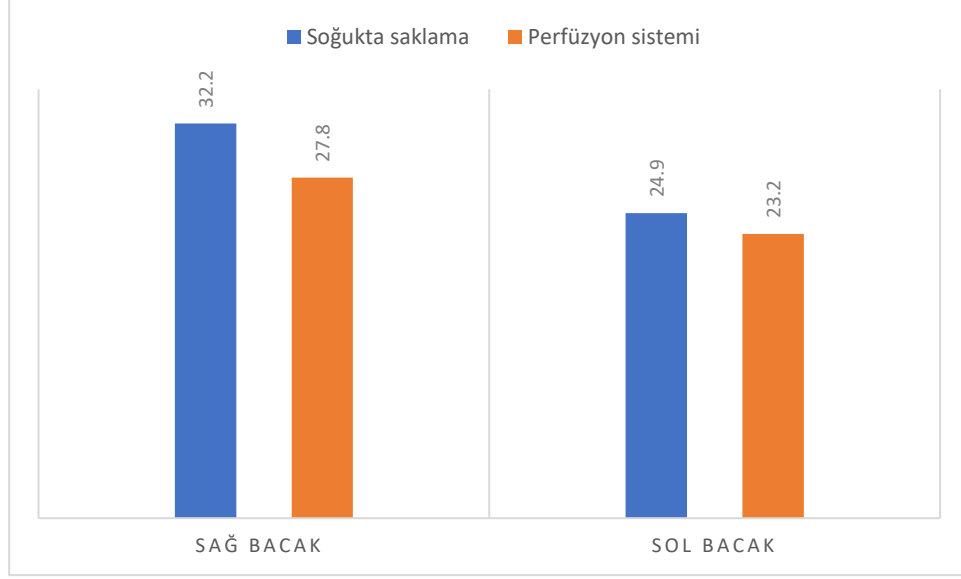
Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde IL-10 değeri soğukta saklama grubunda 43.2 ng/mL perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 43.8 ng/mL olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda IL-10 değeri soğukta saklama grubunda 47.1 ng/mL iken perfüzyon grubunda 54.6 ng/mL olarak bulundu. Hem perfüzyon sisteminde hem de soğukta saklama grubunda IL-10 miktarı cerrahi öncesine göre cerrahi sonrasında artış göstermiştir. Perfüzyon sisteminde anti-inflamatuvar sitokinlerde artış oranı %24.6 iken soğukta saklama yönteminde IL-10 artışı %9 olarak görülmüştür. Bu sonuca bakıldığında IL-10 artışı perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan saklama yönteminde istatistiksel olarak anlamlı şekilde soğukta saklama yöntemine göre yüksektir ($p < 0.05$).



Grafik 15. Kan örneklerinde IL-10 ölçümü

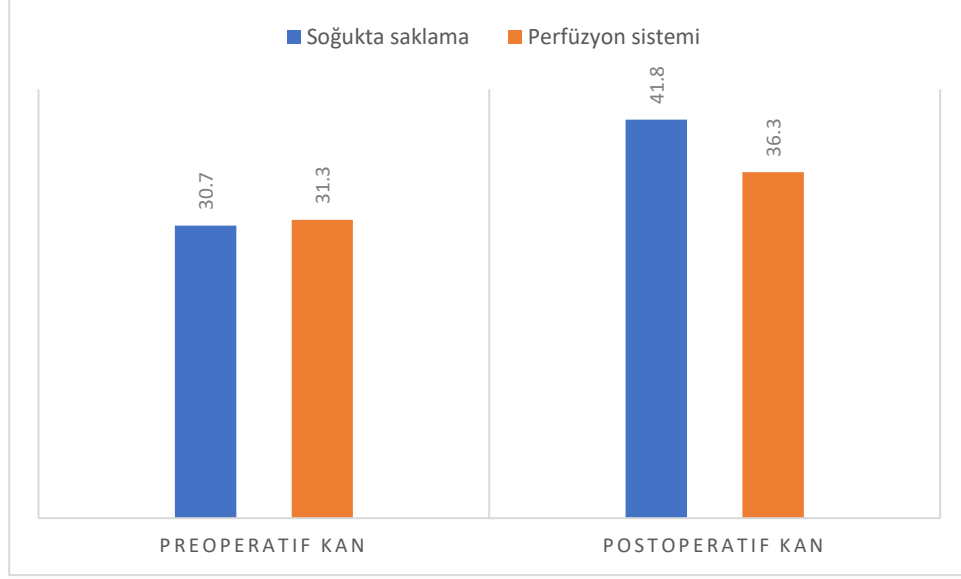
4.4.2. TNF- α Ölçümü

Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacdktan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde TNF- α değeri ortalaması 32.2 ng/mg iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde TNF- α değeri ortalaması 27.8 ng/mg protein olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacadta (Sol bacak) TNF- α değeri 24.9 ng/mg ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 23.2 ng/mg protein olarak gözlemlendi. Soğukta saklama yöntemi ile doku saklama yönteminde perfüzyon grubuna göre TNF- α miktarı istatistiksel anlamlı olarak amputasyon modelinde daha yüksekti. ($p < 0.05$)



Grafik 16. Kas homojenatlarında TNF- α ölçümü

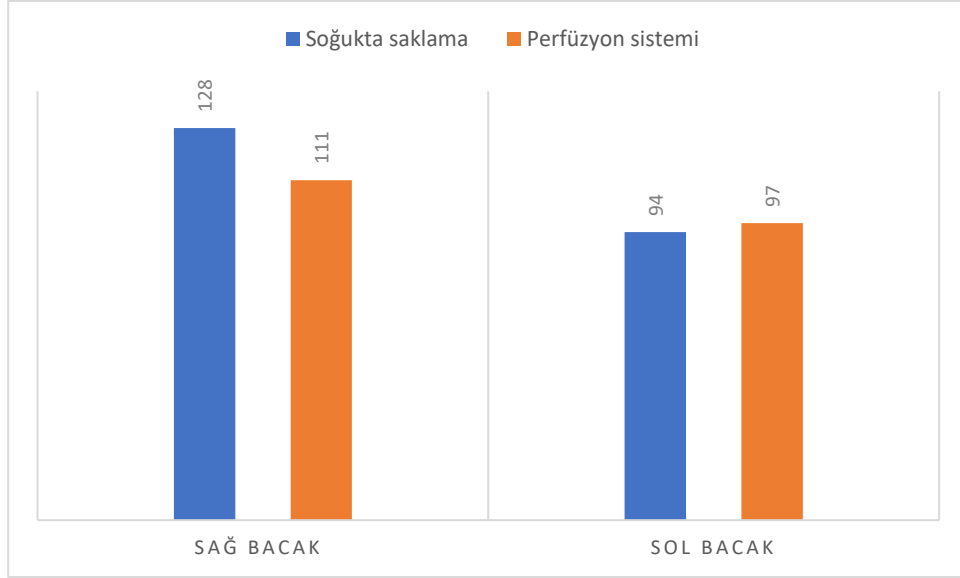
Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde TNF- α değeri soğukta saklama grubunda 30.7 ng/mL, perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 31.3 ng/mL olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda TNF- α değeri soğukta saklama grubunda 41.8 ng/mL iken perfüzyon grubunda 36.3 ng/mL olarak bulundu. Hem perfüzyon sisteminde hem de soğukta saklama grubunda TNF- α miktarı cerrahi öncesine göre cerrahi sonrasında artış göstermiştir. Perfüzyon sisteminde pro-inflamatuvar bir sitokin olan TNF- α artış oranı %16 iken soğukta saklama yönteminde TNF- α artışı %36.1 olarak görülmüştür. Bu sonuca bakıldığında TNF- α artışı perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan saklama yönteminde istatistiksel olarak anlamlı şekilde soğukta saklama yöntemine göre düşüktür. ($p < 0.05$)



Grafik 17. Kan örneklerinde TNF- α ölçümü

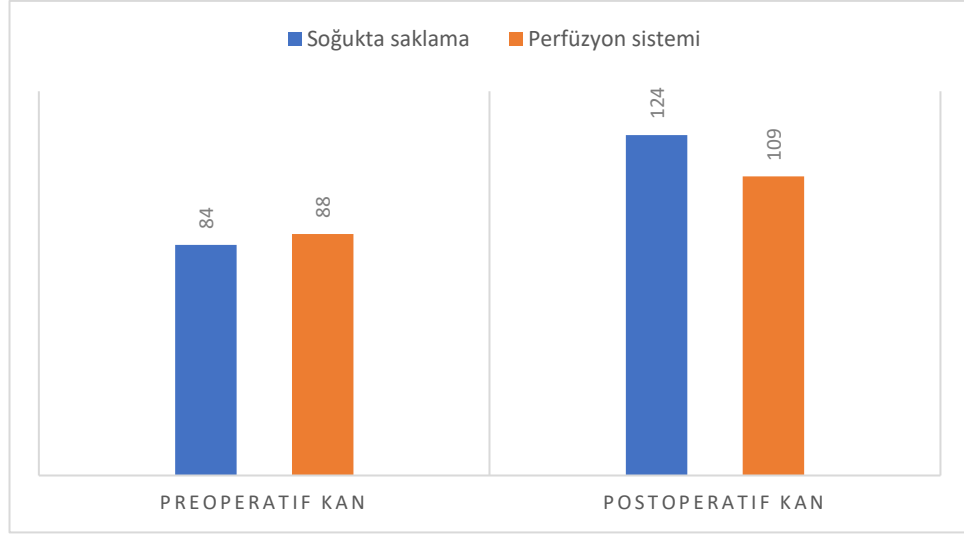
4.4.3. NF-K β Ölçümü

Deneyde amputasyon modeli gerçekleştirilen sağ bacdktan alınan kas homojenatında soğukta saklama yöntemi ile yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde NF-K β değeri ortalaması 128 pg/mg iken, perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon modelinde NF-K β değeri ortalaması 111 pg/mg protein olarak bulundu. Soğukta saklama grubunda kontrol bacadta (Sol bacak) NF-K β değeri 94 pg/mg ve perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 97 pg/mg protein olarak gözlemlendi. Soğukta saklama yöntemi ile doku saklama yönteminde perfüzyon grubuna göre NF-K β daha yüksekti.



Grafik 18. Kas homojenatlarında NF- κ B ölçümü

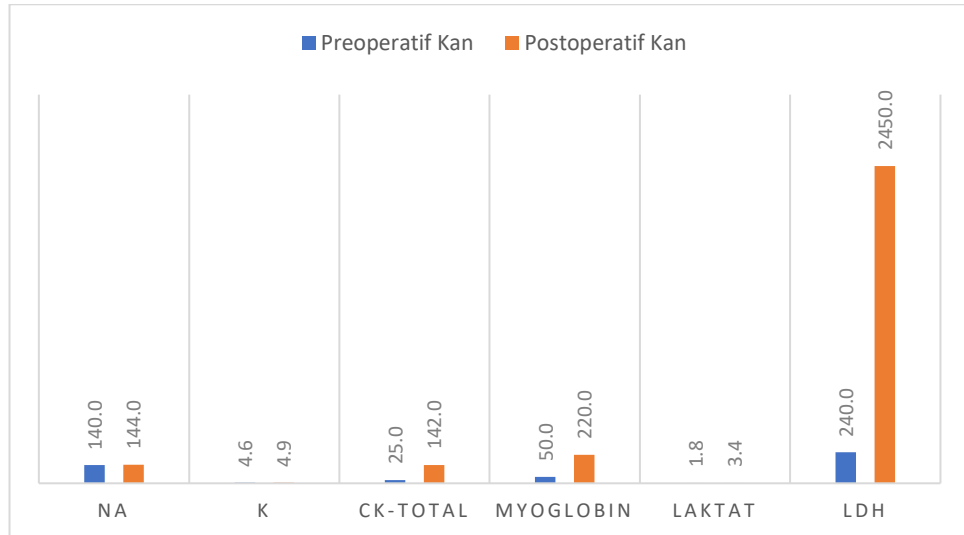
Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Preoperatif kandan alınan örneklerde NF- κ B değeri soğukta saklama grubunda 84 pg/mL, perfüzyon sisteminde bekletilen grupta 88 pg/mL olarak bulundu. Cerrahi bitiminde alınan kanlarda NF- κ B değeri soğukta saklama grubunda 124 pg/mL iken perfüzyon grubunda 109 pg/mL olarak bulundu. Hem perfüzyon sisteminde hem de soğukta saklama grubunda NF- κ B miktarı cerrahi öncesine göre cerrahi sonrasında artış göstermiştir. Perfüzyon sisteminde pro-inflamatuvar bir sitokin olan NF- κ B artış oranı %23.8 iken soğukta saklama yönteminde NF- κ B artışı %47.6 olarak görülmüştür. Bu sonuca bakıldığında NF- κ B artışı perfüzyon sistemi kullanılarak yapılan saklama yönteminde istatistiksel olarak anlamlı şekilde soğukta saklama yöntemine göre düşüktür. ($p < 0.05$)



Grafik 19. Kan örneklerinde NF-K β ölçümü

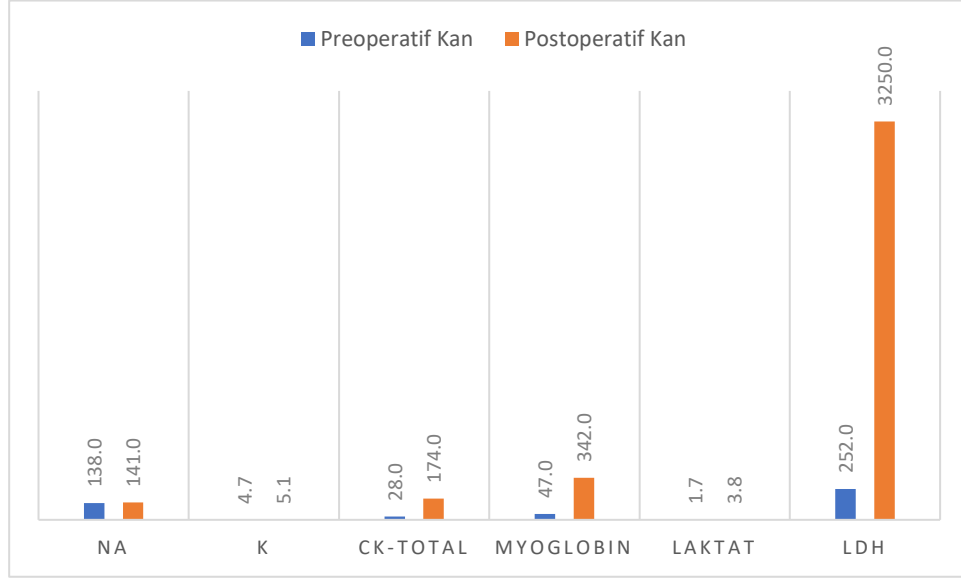
4.4.4. Biyokimyasal parametreler

Kan örnekleri anesteziden hemen sonra cerrahi başlamadan kuyruk veninden alınan kandan ve iskemi/reperfüzyon süresi dolduktan sonra ötenazi öncesinde kalpten alınan kandan incelendi. Alınan kanlarda Na, K, laktat, CK-Total, Myoglobin ve LDH örnekleri alındı. Perfüzyon grubunda CK-total değeri 5.7 kat, myoglobin değeri 4.4 kat ve LDH değeri 10.2 kat artmışken, laktat değeri 1.8 U/mL'den, 3.4 U/mL'ye yükselmiştir. Kan değerleri aşağıdaki grafikte verilmiştir.



Grafik 20. Perfüzyon sistemi ile korunan amputasyon modelinde biyokimyasal parametreler

Soğukta saklama grubunda kan değerine bakıldığında CK değeri 6.2 kat, myoglobin değeri 7.3 kat ve LDH değeri 12.9 kat artmışken, laktat değeri 1.7 U/mL'den, 3.8 U/mL'ye yükselmiştir. Kan değerleri aşağıdaki grafikte verilmiştir.



Grafik 21. Soğukta saklama yöntemi ile korunan amputasyon modelinde biyokimyasal parametreler

Alınan kanlarda CK-Total değeri, myoglobin ve LDH değerlerinde artış olduğu gözlemlendi. Laktat değerindeki değişimin klinik olarak anlamlı olduğu düşünüldü.

5. TARTIŞMA

Solid organ ve kompozit dokuların travma, tümör veya konjenital sebeplerden ötürü eksikliğinin rekonstrüksiyonda önceleri bölgesel olarak doku kapama yöntemleri denenmiş olsa da mikrocerrahinin gelişimi ile replantasyonlar ve otolog serbest doku nakilleri gündeme gelmiştir. Otolog doku replantasyonu veya serbest flepler her defekt için mümkün olmadığından veya işlevsel olarak yetersiz kaldığından, eksik olan dokunun otolog olmayan yöntemlerle rekonstrüksiyonunun ihtiyacı giderek artmaktadır. Otolog olmayan yöntemler arasında fonksiyonel ve estetik olarak kazanımların en yüksek olduğu yöntem ise allojenik olarak dokunun benzeri ile transplantasyonudur.

Yapılan KDT sonrasında erken dönemde gelişebilen inflamatuvar hasar, multi organ yetmezlikleri ve sonrasında gelişebilen akut ve kronik rejeksiyonlar nakledilen dokunun kaybına hatta alıcının ölümüne yol açabilmektedir. Akut ve kronik rejeksiyonu önlemek için immüsupretiflerin kullanımı gerekli hale gelmiştir. İlk olarak steroid ve azatiyoprin kullanılan iki ilaç olsa da siklosporinin keşfi bu alanda yeni bir çağ başlatmıştır. (2) Bu ilaçların gelişmesinin ardından rejeksiyon sıklığı azalsa da ilaç yan etkilerinin yol açtığı sorunlar gündeme gelmiştir. Başta fırsatçı enfeksiyonlar, metabolik dengesizlikler ve maligniteler en sık ortaya çıkan yan etkilerdir. Bu yan etkiler özellikle KDT sonrasında %90lara kadar çıkabilmektedir. (114) Akut ve kronik rejeksiyonu azaltarak bu etkilerden korunmak, cerrahi sonrası erken dönemde oluşabilecek doku hasarını en aza indirmek ve inflamatuvar yanıtı azaltmak için bir diğer korunma yöntemi transplantta gelişen iskemi ve sonrasındaki reperfüzyon hasarını engellemektir.

İskemi reperfüzyon hasarı KDT sonrasında önemli doku kaybı sebeplerindendir. Alınan dokunun iskemi sırasında yetersiz beslenmesi ve ardından ani gelişen reperfüzyonla çok sayıda apoptoz yolağı, sitokin salınımı ve koagülasyon kaskadının aktivasyonu gibi mekanizmalar devreye girer. IRH'yi azaltıcı medikal tedaviler yapılırsa da karmaşık mekanizmasından ötürü tamamen tedavi edici bir ajan bulunmamaktadır. Günümüzde en doğru yöntem iskemi süresini azaltmak ve bu sırada metabolik aktiviteyi sınırlayarak IRH'yi önlemeye çalışıcı manevralardır. Bu amaçla

en sık kullanılan yöntemler nakledilecek dokunun soğukta saklanması veya özel içerikli sıvılarda saklanmasıdır. (1)

Soğukta saklama yöntemi günümüzde en sık kullanılan doku saklama ve taşıma yöntemidir. Kompozit doku veya organ belirli bir solüsyonla yıkandıktan sonra soğutularak hipotermik bir ortam oluşturulur. Bu hipotermiğin temelde iki amacı vardır; hücresel boyutta soğukta kalan yapılarda metabolik aktivite azalır ve hücresel inflamasyon, ödem azalır. Ancak hipotermik ortamda saklama yönteminde dokuya giden oksijenin ve yeterli besinin kesildiği unutulmamalıdır. Ayrıca soğukta metabolik etkinlik azalsa da tamamen sıfıra inmemektedir. Bu sebeple anaerobik ortam koşullarına uyacak şekilde hücrede enerji depoları azalacak ve hücresel metabolitlerin birikimi artacaktır. (115) ATP'nin azalmasıyla hücresel boyutta kalsiyum yükselecek ve bazı yıkıcı enzimlerin aktivasyonu artacaktır. Bütün bunlar hücrede az da olsa lizis ve ödemi arttırır. Bununla birlikte oluşan hücresel metabolitler reperfüzyon esnasında bazı yolakları aktive ederek IRH'yi tetikleyecektir. Bu nedenle soğukta saklama yöntemi de IRH'yi önleyici yeterli bir mekanizma olmayıp ekstrakorporeal dolaşım modellerinin ihtiyacı gündeme gelmiştir.

İlk ekstrakorporeal dolaşım modeli denemeleri 1935 yılında Carrel ve Lindbergh tarafından abdominal organların oksijenize serum ile normotermik koşullarda perfüze edilmesiyle başlatılmıştır. (116) Ardından 1967 yılında klinik olarak ilk defa perfüze edilmiş solid organ nakli Starzl tarafından yapılmıştır. (117) Bu perfüzyon deneylerinde kardiyovasküler cerrahide kullanılan ekstrakorporeal dolaşım pompaları kullanılmış, transplantasyona özel cihazlar kullanılmamıştır. Bu perfüzyon sistemleri altında da organın veya kompozit dokunun perfüzyonu ile devamlı bir oksijen dokuya sağlanmış olur. Buna bağlı olarak hücresel enerji ihtiyacı azalır ve oluşan metabolitlerin birikmesi engellenmiş olur. Böylece oluşacak IRH engellenmiş olur

Makine perfüzyon sistemleri insanda rutin kullanıma girdiğinde ilk sonuçlar 2010 yılında Guarrera tarafından yayınlanmıştır. (118) Karaciğer nakillerinde normotermik koşullarda perfüzyon sistemlerinin kullanılması erken dönemde organ kaybını azalttığını ve biyokimyasal parametreleri daha hızlı düzelttiğini göstermişlerdir. (118) Daha sonra aynı ekip tarafından subnormotermik ve hipotermik

değerlerde de benzer sonuçlar olduğu gösterilmiştir. (119) 2016 yılında Oxford Üniversitesi tarafından “OrganOx Metra®” perfüzyon cihazı için faz 1 çalışmaları yapılmış ve solid organlarda perfüzyon için klinik kullanıma bir cihaz sunulmuştur. (120) Ardından Kanada’da yeni bir perfüzyon cihazı ile benzer sonuçlar elde edilmiştir. (121) İngiltere’de geliştirilen “*Organ Care System®*” cihazı yine bu amaçla klinik kullanıma girmiştir. (122) Bu cihazlar solid organ transplantasyonlarında klinik kullanıma girmiş ve nakillerin başarısını arttırdığı gösterilmiştir. Ancak bu cihazların henüz ekstremitelerde klinik uygunluğu denenmemiştir ve bu alanda halen ancak deneysel çalışmalar yapılmaktadır. Bu sebeple çalışmamızda deneysel bir modelde ekstremitelerde iskemisi oluşturup ekstrakorporeal dolaşım sisteminin etkinliğini incelemeyi amaçladık.

Uzuv nakillerinde ekstrakorporeal dolaşımın kullanılması, özellikle uzamış iskemi süresi yönetimi açısından, soğukta saklama yöntemlerine göre büyük avantajlar sağlar. Özer ve arkadaşları ekstrakorporeal dolaşım sistemiyle korunmuş ekstremitelerde, perfüzyonun oksijen ve birtakım metabolitleri içermesi sebebiyle hücre hasarı soğukta saklamaya göre daha az yaptığından bahsetmiştir. (1) Bir başka çalışmada domuz ekstremitelerde amputasyon modelinde özellikle kas gibi hacmi ve metabolizması yüksek dokularda soğukta saklama yönteminin doku yaşamsallığı açısından yeterli olmadığından, bu dokuların ekstrakorporeal sistemlerle saklanması gerektiğinden bahsedilmiştir. (2) Bu çalışmalarda açıklandığı üzere ekstrakorporeal dolaşım modeli, hücresel bütünlüğün ve işlevselliğin korunmasını sağlayarak uzun süreli iskeminin ekstremitelerde zararlı etkilerini soğukta saklama yöntemine göre azaltmaktadır. Bu bilgilerden yola çıkarak biz de soğukta saklama yöntemi ile ekstrakorporeal dolaşım modelini ekstremitelerde IRH oluşturarak erken dönemde oluşan oksidatif hasar, inflamasyon ve apoptoz açısından birbirleri ile kıyasladık.

Daha önce yapılan perfüzyon deneylerinde farklı solüsyonlar içeren modeller denenmiştir. Bu solüsyonların temel amacı kompozit dokunun yaşamsallığının korunması, elektrolit ve besin dengesinin düzenlenmesi, hücre ölümünün azaltılması ve dokunun ödemlenmesinin engellenmesi olarak sıralanabilir. (7) Solüsyonlardan bir kısmı farklı canlı türlerinden (sıçan, domuz, insan vs.) elde edilen hücresel yapılar içerir. (1) Ancak daha önceki çalışmalarda hücresel yapı içeren solüsyonların immün

yanıtı tetikleyip dokunun sağkalımına negatif etkiler yaptığını gösterilmiştir. (123) Bununla beraber kan hücreleri içeren solüsyonların saklanması ve taşınması aselüler solüsyonlara göre daha maliyetlidir. Aselüler sıvılar içerisinde özellikle osmotik düzenleyici maddeler içeren solüsyonlar doku taşıma ve saklama konusunda daha başarılıdır.(124) Bu amaçla dekstran sıklıkla kullanılmıştır. Bir diğer osmotik düzenleyici olan mannitol, Haberal ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada diğer aselüler sıvılara karşı daha başarılı olduğu gösterilmiştir ancak dekstran içeren solüsyonlara karşı başarısı henüz gösterilmemiştir.(125) Bu sebeple bu çalışmada osmotik düzenleyici bir solüsyon tercih edilmiştir Aselüler yapılar içeren solüsyonlar içerisinde endotel bütünlüğünü koruyan, lökosit adezyonunu düzenleyen ve damar içi plazma hacmini koruyan en önemli yapı taşı dekstrandır. (124) Haug ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada dekstran içeren solüsyonların diğer solüsyonlara göre IRH'yi azaltıcı etkisinin daha yüksek olduğu, kas hasarının daha az olduğu ve mikrodolaşımın daha az etkilendiği gösterilmiştir. (124) Bu çalışmada da bu bilgiler göz önüne alınarak inflamasyonu ve buna bağlı oluşan değişimleri gözlemlemek için dextrans içeren perfadeks solüsyonu seçilmiştir.

Literatüre bakıldığında ekstrakorporeal dolaşım modeli kullanılan çalışmalarda perfüzyon sıvısı seçiminden bağımsız olarak perfüzyon sıvısının sıcaklığı da sınıflandırılmıştır. Hipotermik perfüzyon 0-12° C, mid-termik değerler 13-24° C, subnormotermik değerler 25-34° C, normotermik değerler 35-38° C olarak sınıflanabilir. Daha önceki yapılan çalışmalarda bu sıcaklık değerlerinin hepsinin soğukta saklama yöntemlerine göre üstünlüğü gösterilmiştir. (126) Bununla beraber Özer ve arkadaşları tarafından yapılan çalışmada subnormotermik sıcaklıkta yapılan ekstrakorporeal perfüzyon sonrasında IRH'yi azaltıcı etkilerin olduğu, kas hasarının daha az olduğu ve transplantasyon sonrasında fonksiyonel geri dönüşlerin yüksek olduğu gösterilmiştir. (108) Subnormotermik koşullarda dekstran içeren reomakrodeks kullanımı ile yapılan perfüzyon modelinde dokuda oluşan ödem ve ağırlık artışı da azalmaktadır. Bu durum iskemi süresi arttıkça azalmaktadır. (127). Ancak dekstran içeren çözeltilerin birbirine üstünlükleri ile ilgili iskemi/reperfüzyon modeli çalışmalarına ait bir kanıt yoktur.

Bizim çalışmamızda amputasyon sonrasında replantasyon modeli oluşturularak standart soğukta saklama yöntemi ile ekstrakorporeal perfüzyon modelini kıyasladık. Perfüzyon sıvısı olarak dekstran içeren, özellikle potasyum değeri düşük, transplantasyon deney çalışmalarında etkinliği gösterilmiş ve akciğer transplantasyonlarında klinik kullanımı olan perfadeks solüsyonunu içerisine antibiyotik, antikoagülan ekleyerek ve oksijenize ederek kullandık. Perfüzyon sistemini subnormotermik koşullarda koruduk. Çalışmada özellikle oksidatif hasarı, hücre ölümünü ve inflamatuvar süreçleri irdeledik. Belirteçlerin hem amputasyon yapılan bacaklarda hem de kontrol bacaklarda bakılmasıyla iskemi ve ardından gelen reperfüzyon sürecinin kasta oluşturduğu lokal etkileri ve kandan alınan örneklerde bakılan belirteçlerle de sistemik etkilerini göstermeyi amaçladık.

Daha önceki yapılan çalışmalara bakıldığında literatürde ekstrakorporeal dolaşım modeli kullanılarak yapılan iskemi/reperfüzyon hasarı modellerinde oksidatif hasar ile ilgili yeterli çalışma yoktur. Bu sebeple organizmaya ait oksidan/antioksidan sistemlerin dengesini bu çalışmada farklı parametrelere bakarak inceledik. Ghiselli ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada organizmada bulunan antioksidanların ayrı ayrı ölçümü yerine total antioksidan ölçümü yapmanın antioksidan miktarını belirlemede daha iyi olduğu gösterilmiştir. (128) Bu sebeple bu çalışmada TAS ve TOS değerleri ölçümü yapılmıştır. Sonuçlarımıza göre total antioksidan miktarının perfüzyon sistemleri kullanıldığında arttığı ve total oksidan miktarının perfüzyon sistemi kullanılan gruplarda düştüğü görülmüştür. Bu bulgular daha önce IRH yapılan ve reperfüzyona karşı savunma mekanizmaları kullanılan çalışmalara benzer sonuçlar vermiştir. Erer ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada IRH modeli oluşturulmuş ve ilioprost ile IRH koruyucu tedavi yapıldığında TAS miktarının IRH grubuna göre daha yüksek seviyede olduğunu bildirmiştir. Yine aynı çalışmada tedavi verilen grupta TOS miktarının anlamlı derecede düştüğü gözlenmiştir. (129) Bir başka çalışmada sıçan arka bacağı IRH modelinde de TAS miktarının tedavi verilen bacakta arttığı ve IRH grubunda kontrol grubuna göre düştüğü gözlenmiştir. Aynı şekilde o çalışmada da TOS miktarı tedavi verilen grupta düşmüştür. (130) Bu çalışmalara göre oksidatif hasarı azaltıcı herhangi bir tedavi uygulandığında TAS ve TOS değerleri belirgin olarak değişir. Bu bulgudan yola çıkarak bizim sonuçlarımıza bakıldığında sıçan arka bacağı amputasyon modelinde, ampute edilen bacağın perfadeks solüsyonu ile perfüze

edilmesinin soğukta saklama grubuna göre oksidatif hasara daha az yol açtığı söylenebilir. Daha önceki ekstremite IRH modellerinde ekstrakorporeal dolaşım modeli kullanımının oksidatif etkileri üzerine herhangi bir çalışma yoktur ve bu çalışma literatürde bu konuyu irdeleyen ilk çalışmadır.

Antioksidan bir enzim olan SOD ve antioksidan bir takım enzimde bulunan total thiol miktarına bakıldığında; perfüzyon sisteminde, soğukta saklama sistemine göre kanda ve kas dokusunda her ikisinin yükseldiği gözlenmiştir. Katalaz miktarına bakıldığında kas örneklerinde perfüzyon sistemi ve soğukta saklama grubu arasında anlamlı bir fark görülmemiştir. Bu sonuçlara bakıldığında IRH modelinde antioksidan enzim aktivitesinin perfüzyon sisteminde soğukta saklamaya göre daha fazla aktivite gösterdiği söylenebilir. Ekstremitte üzerine yapılan IRH modellerinde oksidatif hasarı gösteren enzimatik aktivitelere daha önce bakılmamıştır. Bir çalışmada testiküler torsiyon modeli kullanılarak yapılan IRH modelinde SOD miktarının ve total thiol miktarının sadece detorsiyon cerrahisi yapılan modele göre cerrahi+ek reperfüzyonu artırıcı tedaviler verildiğinde arttığı gözlenmiştir. (131) Total thiol miktarının sıçan arka bacak IRH modelinde araştırıldığı bir çalışmada, antioksidan tedavi verilen grupta total thiol miktarının IRH grubuna göre anlamlı arttığı gözlenmiştir. (132) Bir başka çalışmada ise oksidatif sistemin “*knock out*” yapıldığı bir deney modelinde de SOD miktarının benzer şekilde antioksidan tedavilerle arttığı ve katalaz miktarının değişmediği gözlenmiştir. (133) Ancak bunun aksine katalaz miktarının antioksidan tedavilerle arttığını gösteren çalışmalar da mevcuttur. (134) Bahsedilen çalışmada katalaz miktarının artması için genetik olarak ekspresyonun artması gerektiği ve miktarına beşinci gün bakıldığından bahsedilmiştir. Katalaz miktarı özellikle karaciğerde çok yüksek iken kalp kası gibi dokularda miktarı oldukça azdır ve artışının gözlenmesi için oksidan etkinin daha geç dönemlerinde bakılması gerekebilir. (135) Bizim sonuçlarımıza göre katalaz miktarının değişmemesinin sebebi; kas dokusunda katalaz miktarının daha az olmasından dolayı yeterli miktarda değişimin gözlenmemesi veya çalışmamızda IRH'nin erken dönem etkilerinin gözlenmesinden ötürü yeterli sürenin geçmemesi olabilir. Sonuç olarak perfüzyon sisteminde saklanan amputatlarda antioksidan enzim artışı ve antioksidan miktarı soğukla saklama yöntemine göre daha yüksek görülmektedir.

6 saatlik iskemi ve ardından 1 saatlik reperfüzyon sonunda kas homojenatından alınan örneklerde perfüzyon grubu ve soğukta saklama grubu arasında apoptozu gösteren bcl-2 ve bax proteinleri açısından anlamlı bir değişim gözlenmedi. Bununla beraber hematoksilen/eozin boyamasında da apoptoz veya nekroza yönelik bulgu saptanmadı. Knight ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada hücre ölümünün görüldüğü zamanın iskeminin ardından 24 saatlik reperfüzyondan sonra görüldüğünden bahsedilmiştir. (136) Bir başka çalışmada deney hayvanlarında iskemiye daha duyarlı olan beyin dokusunda bile bcl-2, bax ve diğer apoptotik parametlerin değişiminin 12-48 saatlik reperfüzyonun ardından başladığı gösterilmiştir. (137) Özer ve arkadaşlarının domuz kullanarak yaptığı bir çalışmada deneysel IRH modelinde apoptozun 24 saatlik iskemi ve 12 saatlik reperfüzyon sonrasında görülebildiği belirtilmiştir. (108) Bizim çalışmamızda da reperfüzyon sonrasında birinci saatte deney hayvanları sakrifiye edilip örnekler alınarak akut etkiler incelendiğinden sıçan arka bacağındaki kas veya diğer dokularda hücre ölümüne dair bir bulguya rastlanmadı.

Histopatolojik değişikliklere bakıldığında 6 saatlik iskemi ve 1 saatlik reperfüzyon sonrasında özellikle mitokondriyal irileşme, mitokondriyal belirginleşme ve subsarkolemmal yer değiştirmenin soğukta saklama grubuna göre perfadeks ile perfüze edilen sıçan arka bacağına daha az olduğu görülmüştür. Kueckelhaus ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada perfadeks solüsyonu ile perfüze edilen grupta soğukta saklama grubuna göre kas lifi hasarının daha az olduğu ve mitokondriyal belirginleşmenin daha az olduğu gösterilmiştir. (2) Bu bulgular bizim çalışmamızda elde ettiğimiz verileri desteklemektedir. İskemi/reperfüzyon hasarının hücresel boyutta ilk bulgusu mitokondriyal hasarlanmanın başlamasıdır. Doku ve organizma düzeyinde hasarı görmek için daha uzun reperfüzyon süresi gerekir. Bu süre farklı deney modellerinde değişkenlik göstermekle beraber reperfüzyonun 3-8. saatleri arasında başlar. (2) (115) (136)

Subsarkolemmal mitokondriler hücre yüzeyinde bulunan ve özellikle hücre sinyallerinde rol alan mitokondri alt tipiyken intermyofibriller mitokondriler oksidatif solunumu fazla yaparak kas fonksiyonunda etki gösterirler. (138) Bir çalışmada subsarkolemmal yerleşimli mitokondrilerin süperoksit anyonlarının fazla bulunduğu

ortamda arttığı gösterilmiştir. (139) Daha önceki çalışmalarda IRH modellerinde mitokondriyal yer değişim ile ilgili herhangi bir veri yoktur. Bu çalışmada perfüzyon sistemi kullanılan IRH modelinde soğukta saklama modeline göre mitokondriyal irileşme ve subsarkolemmal dağılımın daha az olduğu görülmüştür. Mitokondriyal bozulma perfüzyon sistemi ile saklanan grupta soğukta saklama grubuna göre daha azdır. Bu da perfüzyonun iskemik hasara daha az yol açtığını gösterir.

Çalışmamızda anti-inflamatuvar bir sitokin olan IL-10 miktarı kas ve kan örneklerinde perfüzyon sistemlerinde soğukta saklama grubuna göre daha yüksek görüldü. Daha önce yapılan bir çalışmada IL-10 miktarının laminektomi yapılan sıçanlarda yükseldiği, fibrozis engelleyici ajanların verildiği grupta ise inflamasyonun azaldığı ve IL-10 miktarının arttığı gözlenmiştir. (140) Öztürk ve arkadaşlarının yaptığı bir IRH modelinde 6 saatlik iskemi ve 1 saatlik reperfüz uygulanan testis modelinde IL-10 tedavisi alan grupta belirgin bir inflamasyonda azalma, histopatolojik iyileşme ve oksidan miktarının azaldığı gözlenmiştir. (141) Bir başka çalışmada ise IL-10 ekspresyonu durdurulan farelerde yapılan IRH modelinde inflamasyonun IL-10 sentezleyebilen farelere göre fazla olduğu ve doku hasarının arttığı gösterilmiştir. (142) Bu çalışmalar göz önüne alındığında IL-10 miktarının artışının inflamatuvarı baskılayıcı ve doku hasarını azaltıcı etkisi olduğu söylenebilir.

IRH modeli yapılan bu deneyde proinflamatuvar sitokinlerin (TNF- α ve NF- κ B) miktarı hem kas homojenatında hem de kanda perfüzyon sisteminde soğukta saklama grubuna göre daha düşüktü. Daha önce yapılan bir çalışmada TNF- α miktarının laminektomi yapılan sıçanlarda yükseldiği, fibrozis engelleyici ajanların verildiği grupta ise inflamasyonun azaldığı ve TNF- α miktarının da azaldığı gözlenmiştir. (140) Bir başka çalışmada platelat aktivasyonunu önleyen salvianolik asitin kullanımı ile 6 saatlik iskemi ve 24 saatlik reperfüzyon yapılan sıçan arka bacağı IRH modelinde IL-8, ICAM-1, TNF- α , IL-1 β , CK ve NF- κ B miktarlarının hem kanda hem de dokuda tedavi verilmeyen gruba göre belirgin azaldığı gösterilmiştir. (143) Özellikle alt ekstremitelerde IRH sonrasında akciğerlerde hasar ve inflamatuvar hücre birikimi belirgin artar. Bunun mekanizmasında en önemli sitokinlerden birisi TNF- α olarak düşünülmektedir. (144) Xue ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada sıçan arka bacağı IRH modelinde anti-inflamatuvar ajan kullanılan deneklerde IL-1, IL-6, TNF-

α , ve NF- κ B gen ekspresyonunun azaldığı gösterilmiştir. Buna bağlı olarak hem lokal hem de sistemik etkiler düzelmiş, akciğer hasarı ve akciğerde inflamatuvar hücre birikimi azalmıştır. (144) Bizim sonuçlarımız bu sonuçları desteklemektedir. Perfüzyon sistemi ile saklanan amputatlarda soğukta saklamaya göre belirgin pro-inflamatuvar sitokinlerde azalma görülür. Bu etki sistemik olarak da inflamasyon miktarını azaltarak sistemik yan etkileri ve organ hasarını azaltır.

Cerrahi başlamadan hemen önce alınan kanlar ve ötenazi öncesi alınan kan örneklerinden biyokimyasal parametreler incelendiğinde perfüzyon grubunda doku hasarını gösteren CK, laktat, myoglobin ve LDH değerlerinin soğukta saklama grubuna göre artışının daha az olduğu görüldü. Daha önceki çalışmalarda sıçanlarda ekstremitte IRH modelinde biyokimyasal parametreler yeteri kadar değerlendirilememiştir. Yassin ve arkadaşlarının yaptığı bir çalışmada iskemi sonrasında reperfüzyonla biyokimyasal parametrelerin bozulduğu ve bu bozulmanın reperfüzyon süresi arttıkça 3 saate kadar devam ettiği gösterilmiştir. (145) Bir başka çalışmada domuzlarda yapılan ekstremitte amputasyonunda perfüzyon ve soğukta saklama modelleri kıyaslanmış, her iki grupta asidozun geliştiği ancak iki grup arasında asidoz açısından anlamlı bir farkın olmadığı, myoglobin ve K değerlerinin ise soğukta saklama grubunda perfüzyon grubuna göre daha fazla artış gösterdiği belirtilmiştir. (2) Bizim çalışmamızda sıçan modellerinde biyokimyasal parametrelerin artışın daha fazla olmasının sebebi, sıçan metabolizmasının daha hızlı olması olabilir. Bizim verilerimize göre kas yıkım parametreleri soğukta saklama grubunda perfüzyon sistemine göre daha fazla artış göstermiştir. Ancak bu konuda daha fazla çalışmaya ihtiyaç vardır.

İskemi/Reperfüzyon hasarı özellikle yüksek hacimli kas içeren alt ekstremitte replantasyonları ve kompozit doku transplantasyonlarında başarısızlığın en önemli sebebidir. Bu tür nakil cerrahileri sonrasında IRH sık görülür ve tedavi sonuçları oldukça yetersizdir. (146) Bu sebepten ötürü nakledilen organ yaşasa bile fonksiyonel olarak yetersiz bir sonuç görülebilir. Özellikle alt ekstremitte transplantasyonları veya kombine KDT sonrasında oluşan IRH lokal olarak kası etkilemekle beraber sistemik inflamatuvar yanıtı tetikleyip multi organ yetmezliğine götürebilir. (3) (145) Sistemik etkilerin mekanizması oldukça karışık olsa da özellikle reperfüzyonun erken

döneminde oluşan hücresel düzeyde enerji metabolizmasında bozukluk, inflamatuvar sitokinlerin ve hücrelerin etkileri, reaktif oksijen moleküllerinin etkileri ile ortaya çıkan oksidatif süreç ve sonrasında oluşan apoptoz ve nekroz yollarının aktivasyonu gibi çok fazla yolak bu olayda etkilidir. Daha önceki yapılan amputasyon modellerinde özellikle ekstrakorporeal dolaşımın soğukta saklama grubuna göre üstünlüğü farklı açılardan bildirilmiştir. (1) Ancak daha önce yapılan ekstrakorporeal dolaşım modellerinde IRH'nin patogeneziye yönelik yeterli veri yoktur. Bu sebeple bizim çalışmamızda ekstrakorporeal dolaşım modeli kullanılarak oluşturulan IRH modelinde erken dönemde oluşan oksidatif hasar, inflamatuvar süreçler ve histopatolojik bulguları beraber inceleyerek patogenezi ortaya koymayı da amaçladık. Bulgularımıza bakıldığında ekstrakorporeal dolaşım modelinin kullanılması sıçanlarda oksidatif hasarı ve inflamatuvar süreçleri azaltmaktadır. Bu durum göz önüne alındığında yüksek kas hacimli dokuların replantasyonu veya KDT sırasında iskemik kalan amputatın ekstrakorporeal dolaşım sisteminde saklanması uzun dönemde oluşacak organ hasarını ve SIYS'i engelleyerek bu cerrahilerin başarısını arttırabilir.

6. SONUÇ

Literatürdeki majör ekstremitte replantasyonu ve transplantasyonu sonuçlarının parmak amputasyonlarından ve solid organ transplantasyonlarından daha başarısız sonuçları olmasının temel sebebi hem kas kitlesinin daha fazla olması hem de soğukta saklama süresinin uzaması sebebiyle ekstremitede oluşan akut iskemi-reperfüzyon hasarının daha fazla sistemik inflamatuvar yanıt oluşturmasıdır. Oluşan bu inflamatuvar yanıt sonrasında nakledilen ekstremitte kaybedilebilmekte hatta hasta ölümleri görülebilmektedir. Bu sebeple inflamatuvar yanıtı azaltmak için ekstrakorporeal dolaşım modelleri gündeme gelmiştir. Bu çalışma; ekstrakorporeal dolaşım modeli kullanarak inflamatuvar değişimleri, oksidatif hasarı ve histopatolojik parametreleri birbiri ile ilişkili olarak aynı anda irdeleyen ve bunu rutinde kullanılan soğukta saklama sistemi ile karşılaştıran literatürdeki ilk çalışmadır.

Deney sonucunda elde ettiğimiz verilere bakıldığında ampute edilen ekstremitenin ekstrakorporeal dolaşım sistemleri sayesinde saklanması soğukta saklama sistemine göre inflamatuvar yanıtı daha az oluşturmakta, oksidatif hasarı azaltmaktadır. Biyokimyasal olarak kas yıkım ürünlerinin oluşumu ve sistemik metabolik yük soğukta saklama sisteminde perfüzyon sistemine göre daha fazla artmaktadır. İskemi reperfüzyon hasarının erken dönem sonuçları bu çalışmanın temel amacı olduğundan hücre ölümü ve nekroz açısından bir değerlendirme yapılamamıştır.

Bu modeller daha büyük hayvan türlerinde denenmeli ve sonrasında insan çalışmalarında majör ekstremitte replantasyonları/transplantasyonları veya çoklu ekstremitte nakillerinde kullanıma girmelidir. Bu uygulamanın nakil sonrasında alıcıda daha az hasara yol açıp ekstremitte kaybı oranlarını azaltacağını ve sistemik etkilenmeyi daha az oluşturacağını düşünüyoruz. Bununla beraber ekstrakorporeal dolaşım sistemleri/cihazları solid organ transplantasyonlarında rutin kullanıma girmiş olup ekstremitte perfüzyonu için halen buna uygun bir sistem rutinde kullanılamamaktadır. Bu çalışmanın ve benzer çalışmaların sonuçlarından yola çıkarak böyle bir cihazın üretiminin ve klinik rutin kullanımının kompozit doku nakillerinin ve majör ekstremitte replantasyonlarının hem sağkalımını hem de fonksiyonel kazanımlarını arttıracığını düşünüyoruz.

7. KAYNAKLAR

1. Ozer K. Advances in limb preservation: from replantation to transplantation. *J Hand Surg Am.* 2020;45(7):626–37.
2. Kueckelhaus M, Dermietzel A, Alhefzi M, Aycart MA, Fischer S, Krezdorn N, et al. Acellular hypothermic extracorporeal perfusion extends allowable ischemia time in a porcine whole limb replantation model. *Plast Reconstr Surg.* 2017;139(4):922e-932e.
3. Nasir S, Kilic YA, Karaaltin MV, Erdem Y. Lessons learned from the first quadruple extremity transplantation in the world. *Ann Plast Surg.* 2014;73(3):336–40.
4. Akateh C, Beal EW, Whitson BA, Black SM. Normothermic ex-vivo liver perfusion and the clinical implications for liver transplantation. *J Clin Transl Hepatol.* 2018;6(3):276.
5. de Vries RJ, Tessier SN, Banik PD, Nagpal S, Cronin SEJ, Ozer S, et al. Supercooling extends preservation time of human livers. *Nat Biotechnol.* 2019;37(10):1131–6.
6. Eshmuminov D, Becker D, Bautista Borrego L, Hefti M, Schuler MJ, Hagedorn C, et al. An integrated perfusion machine preserves injured human livers for 1 week. *Nat Biotechnol.* 2020;38(2):189–98.
7. Müller C, Fürst H, Reichenspurner H, Briegel J, Groh J, Reichart B, et al. Lung procurement by low-potassium dextran and the effect on preservation injury. *Transplantation.* 1999;68(8):1139–43.
8. Swearingen B, Ravindra K, Xu H, Wu S, Breidenbach WC, Ildstad ST. The science of composite tissue allotransplantation. *Transplantation.* 2008;86(5):627.
9. Black KS, Hewitt CW, Fraser LA, Osborne JG, Achauer BM, Martin DC, et al. Cosmas and Damian in the laboratory. *N Engl J Med.* 1982;306(6):368–9.
10. https://en.wikipedia.org/wiki/Saints_Cosmas_and_Damian. No Title.
11. Gilbert R. Transplant is successful with a cadaver forearm. *Med Trib Med News.* 1964;5(2):20–1.
12. Hewitt CW, Black KS, Fraser LA, HOWARD EB. Composite tissue (limb) allografts in rats. *Transplantation.* 1985;39(1):1.
13. BENHAIM P, ANTHONY JP, LIN LYT, MCCALMONT TH, MATHES SJ. A long-term study of allogeneic rat hindlimb transplants immunosuppressed with RS-61443. *Transplantation.* 1993;56(4):911–7.

14. Allison TL. Immunosuppressive therapy in transplantation. *Nurs Clin*. 2016;51(1):107–20.
15. Holt CD. Overview of immunosuppressive therapy in solid organ transplantation. *Anesthesiol Clin*. 2017;35(3):365–80.
16. Dubernard JM, Owen E, Herzberg G, Lanzetta M, Martin X, Kapila H, et al. Human hand allograft: report on first 6 months. *Lancet*. 1999;353(9161):1315–20.
17. Dubernard JM, Petruzzo P, Lanzetta M, Parmentier H, Martin X, Dawahra M, et al. Functional results of the first human double-hand transplantation. *Ann Surg*. 2003;238(1):128.
18. Zuker RM, Redett R, Alman B, Coles JG, Timoney N, Ein SH. First successful lower-extremity transplantation: technique and functional result. *J Reconstr Microsurg*. 2006;22(04):239–44.
19. Shores JT, Brandacher G, Lee WPA. Hand and upper extremity transplantation: an update of outcomes in the worldwide experience. *Plast Reconstr Surg*. 2015;135(2):351e-360e.
20. Kirk AD. Immunosuppression without immunosuppression? How to be a tolerant individual in a dangerous world. *Transpl Infect Dis*. 1999;1(1):65–75.
21. Büttemeyer R, Jones NF, Min Z, Rao U. Rejection of the component tissues of limb allografts in rats immunosuppressed with FK-506 and cyclosporine. *Plast Reconstr Surg*. 1996;97(1):139–48.
22. He J, Khan UZ, Qing L, Wu P, Tang J. Improving the ischemia-reperfusion injury in vascularized composite allotransplantation: Clinical experience and experimental implications. *Front Immunol*. 2022;13:998952.
23. Serafin D, Georgiade NG, Mullen RY, Lesesne CB. Transcutaneous PO2 monitoring for assessing viability and predicting survival of skin flaps: experimental and clinical correlations. *Microsurgery*. 1981;2(3):165–78.
24. Cooley BC, Hansen FC, Dellon AL. The effect of temperature on tolerance to ischemia in experimental free flaps. *Microsurgery*. 1981;3(1):11–4.
25. Karpati G, Pouliot Y, Carpenter S. Expression of immunoreactive major histocompatibility complex products in human skeletal muscles. *Ann Neurol Off J Am Neurol Assoc Child Neurol Soc*. 1988;23(1):64–72.
26. Wagh M, Pantazi G, Romeo R, Hurley J V, Morrison WA, Knight KR. Cold storage of rat skeletal muscle free flaps and pre-ischemic perfusion with modified UW solution. *Microsurg Off J Int Microsurg Soc Eur Fed Soc Microsurg*. 2000;20(7):343–9.
27. Kerrigan CL, Daniel RK. Critical ischemia time and the failing skin flap. *Plast*

- Reconstr Surg. 1982;69(6):986–9.
28. Shino K, Kawasaki T, Hirose H, Gotoh I, Inoue M, Ono K. Replacement of the anterior cruciate ligament by an allogeneic tendon graft. An experimental study in the dog. *J Bone Jt Surg Br Vol.* 1984;66(5):672–81.
 29. Guimberteau JC, Baudet J, Panconi B, Boileau R, Potaux L. Human allotransplant of a digital flexion system vascularized on the ulnar pedicle: a preliminary report and 1-year follow-up of two cases. *Plast Reconstr Surg.* 1992;89(6):1135–47.
 30. Mackinnon SE, Doolabh VB, Novak CB, Trulock EP. Clinical outcome following nerve allograft transplantation. *Plast Reconstr Surg.* 2001;107(6):1419–29.
 31. Evans PJ, Mackinnon SE, Levi ADO, Wade JA, Hunter DA, Nakao Y, et al. Cold preserved nerve allografts: changes in basement membrane, viability, immunogenicity, and regeneration. *Muscle Nerve Off J Am Assoc Electrodiagn Med.* 1998;21(11):1507–22.
 32. Shin SJ, Qi WN, Cai Y, Rizzo M, Goldner RD, Nunley II JA, et al. Inhibition of inducible nitric oxide synthase promotes recovery of motor function in rats after sciatic nerve ischemia and reperfusion. *J Hand Surg Am.* 2005;30(4):826–35.
 33. Iida H, Schmelzer JD, Schmeichel AM, Wang Y, Low PA. Peripheral nerve ischemia: reperfusion injury and fiber regeneration. *Exp Neurol.* 2003;184(2):997–1002.
 34. Briscoe DM, Alexander SI, Lichtman AH. Interactions between T lymphocytes and endothelial cells in allograft rejection. *Curr Opin Immunol.* 1998;10(5):525–31.
 35. Yang Q, He GW, Underwood MJ, Yu CM. Cellular and molecular mechanisms of endothelial ischemia/reperfusion injury: perspectives and implications for postischemic myocardial protection. *Am J Transl Res.* 2016;8(2):765.
 36. Aboo Bakkar Z, Fulford J, Gates PE, Jackman SR, Jones AM, Bond B, et al. Prolonged forearm ischemia attenuates endothelium-dependent vasodilatation and plasma nitric oxide metabolites in overweight middle-aged men. *Eur J Appl Physiol.* 2018;118:1565–72.
 37. Friedlaender GE, Strong DM, Sell KW. Studies on the antigenicity of bone. I. Freeze-dried and deep-frozen bone allografts in rabbits. *JBJS.* 1976;58(6):854–8.
 38. Berggren A, Weiland AJ, Dorfman H. The effect of prolonged ischemia time on osteocyte and osteoblast survival in composite bone grafts revascularized by microvascular anastomoses. *Plast Reconstr Surg.* 1982;69(2):290–8.

39. Yarlagadda SG, Coca SG, Formica Jr RN, Poggio ED, Parikh CR. Association between delayed graft function and allograft and patient survival: a systematic review and meta-analysis. *Nephrol Dial Transplant*. 2009;24(3):1039–47.
40. Carden DL, Granger DN. Pathophysiology of ischaemia–reperfusion injury. *J Pathol*. 2000;190(3):255–66.
41. Evora PRB, Pearson PJ, Schaff H V. Impaired endothelium-dependent relaxation after coronary reperfusion injury: evidence for G-protein dysfunction. *Ann Thorac Surg*. 1994;57(6):1550–6.
42. Kumar V, Abbas AK, Fausto N, Aster JC. Robbins and Cotran pathologic basis of disease, professional edition e-book. Elsevier health sciences; 2014.
43. Müller T, Dewitz C, Schmitz J, Schröder AS, Bräsen JH, Stockwell BR, et al. Necroptosis and ferroptosis are alternative cell death pathways that operate in acute kidney failure. *Cell Mol Life Sci*. 2017;74:3631–45.
44. Hasche ET, Fernandes C, Freedman S Ben, Jeremy RW. Relation between ischemia time, infarct size, and left ventricular function in humans. *Circulation*. 1995;92(4):710–9.
45. Lee PJ, Choi AMK. Pathways of cell signaling in hyperoxia. *Free Radic Biol Med*. 2003;35(4):341–50.
46. Hentia C, Rizzato A, Camporesi E, Yang Z, Muntean DM, Săndesc D, et al. An overview of protective strategies against ischemia/reperfusion injury: The role of hyperbaric oxygen preconditioning. *Brain Behav*. 2018;8(5):e00959.
47. De Almeida TN, Victorino JP, Liu JB, Campos DTQ, Graf C, Jordani MC, et al. Effect of hepatic preconditioning with the use of methylene blue on the liver of wistar rats submitted to ischemia and reperfusion. In: *Transplantation proceedings*. Elsevier; 2018. p. 841–7.
48. Lin X, Xiao W, Xiao L, Liu M. Molecular mechanisms of autophagy in cardiac ischemia/reperfusion injury. *Mol Med Rep*. 2018;18(1):675–83.
49. Renaldo Fernández A, Sánchez Tarjuelo R, Cravedi P, Ochando J, López Hoyos M. Ischemia Reperfusion Injury? A Translational Perspective in Organ Transplantation. 2020;
50. Krüger B, Krick S, Dhillon N, Lerner SM, Ames S, Bromberg JS, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation. *Proc Natl Acad Sci*. 2009;106(9):3390–5.
51. Köhler D, Devanathan V, Bernardo de Oliveira Franz C, Eldh T, Novakovic A, Roth JM, et al. *Gai2*-and *Gai3*-deficient mice display opposite severity of myocardial ischemia reperfusion injury. *PLoS One*. 2014;9(5):e98325.
52. Girardi G, Lingo JJ, Fleming SD, Regal JF. Essential role of complement in

- pregnancy: from implantation to parturition and beyond. *Front Immunol.* 2020;11:1681.
53. Schröppel B, Akalin E, Baweja M, Bloom RD, Florman S, Goldstein M, et al. Peritransplant eculizumab does not prevent delayed graft function in deceased donor kidney transplant recipients: Results of two randomized controlled pilot trials. *Am J Transplant.* 2020;20(2):564–72.
 54. Jordan SC, Choi J, Aubert O, Haas M, Loupy A, Huang E, et al. A phase I/II, double-blind, placebo-controlled study assessing safety and efficacy of C1 esterase inhibitor for prevention of delayed graft function in deceased donor kidney transplant recipients. *Am J Transplant.* 2018;18(12):2955–64.
 55. Monbaliu D, De Vries B, Crabbe T, Van Heurn E, Verwaest C, Roskams T, et al. Liver fatty acid-binding protein: an early and sensitive plasma marker of hepatocellular damage and a reliable predictor of graft viability after liver transplantation from non-heart-beating donors. In: *Transplantation proceedings.* Elsevier; 2005. p. 413–6.
 56. Kadkhodae M, Mikaeili S, Zahmatkesh M, Golab F, Seifi B, Arab HA, et al. Alteration of renal functional, oxidative stress and inflammatory indices following hepatic ischemia-reperfusion. *Gen Physiol Biophys.* 2012;31(2):195–202.
 57. Jin R, Liu L, Zhang S, Nanda A, Li G. Role of inflammation and its mediators in acute ischemic stroke. *J Cardiovasc Transl Res.* 2013;6:834–51.
 58. Chan JK, Roth J, Oppenheim JJ, Tracey KJ, Vogl T, Feldmann M, et al. Alarmins: awaiting a clinical response. *J Clin Invest.* 2012;122(8):2711–9.
 59. Cui P, Fang X. Pathogenesis of infection in surgical patients. *Curr Opin Crit Care.* 2015;21(4):343.
 60. Margraf A, Ludwig N, Zarbock A, Rossaint J. Systemic inflammatory response syndrome after surgery: mechanisms and protection. *Anesth Analg.* 2020;131(6):1693–707.
 61. Hotamisligil GS, Shargill NS, Spiegelman BM. Adipose expression of tumor necrosis factor- α : direct role in obesity-linked insulin resistance. *Science* (80-). 1993;259(5091):87–91.
 62. Bianchi ME. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. *J Leucoc Biol.* 2007;81(1):1–5.
 63. Margraf A, Herter JM, Kühne K, Stadtmann A, Ermert T, Wenk M, et al. 6% Hydroxyethyl starch (HES 130/0.4) diminishes glycocalyx degradation and decreases vascular permeability during systemic and pulmonary inflammation in mice. *Crit Care.* 2018;22(1):1–12.
 64. Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At

- the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 2014;1843(11):2563–82.
65. Schwarzenberger, Borstel, Gehring, Ocklitz, Wagner, Schmucker, et al. Perioperative cytokine release during coronary artery bypass grafting in patients of different ages. *Clin Exp Immunol.* 1998;114(1):26–32.
 66. Wu MY, Yiang GT, Liao WT, Tsai APY, Cheng YL, Cheng PW, et al. Current mechanistic concepts in ischemia and reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem.* 2018;46(4):1650–67.
 67. Yang X, Chang Y, Wei W. Endothelial dysfunction and inflammation: immunity in rheumatoid arthritis. *Mediators Inflamm.* 2016;2016.
 68. Herter J, Zarbock A. Integrin regulation during leukocyte recruitment. *J Immunol.* 2013;190(9):4451–7.
 69. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F. The role of macrophages in acute and chronic wound healing and interventions to promote pro-wound healing phenotypes. *Front Physiol.* 2018;9:419.
 70. Schauer RJ, Kalmuk S, Gerbes AL, Leiderer R, Meissner H, Schildberg FW, et al. Intravenous administration of glutathione protects parenchymal and non-parenchymal liver cells against reperfusion injury following rat liver transplantation. *World J Gastroenterol.* 2004;10(6):864.
 71. Lecour S. Activation of the protective Survivor Activating Factor Enhancement (SAFE) pathway against reperfusion injury: does it go beyond the RISK pathway? *J Mol Cell Cardiol.* 2009;47(1):32–40.
 72. Schinzel AC, Takeuchi O, Huang Z, Fisher JK, Zhou Z, Rubens J, et al. Cyclophilin D is a component of mitochondrial permeability transition and mediates neuronal cell death after focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci.* 2005;102(34):12005–10.
 73. Javadov S, Jang S, Parodi-Rullán R, Khuchua Z, Kuznetsov A V. Mitochondrial permeability transition in cardiac ischemia–reperfusion: whether cyclophilin D is a viable target for cardioprotection? *Cell Mol Life Sci.* 2017;74:2795–813.
 74. Ikeda G, Matoba T, Nakano Y, Nagaoka K, Ishikita A, Nakano K, et al. Nanoparticle-mediated targeting of cyclosporine A enhances cardioprotection against ischemia-reperfusion injury through inhibition of mitochondrial permeability transition pore opening. *Sci Rep.* 2016;6(1):20467.
 75. Bibli SI, Papapetropoulos A, Iliodromitis EK, Daiber A, Randriamboavonjy V, Steven S, et al. Nitroglycerine limits infarct size through S-nitrosation of cyclophilin D: a novel mechanism for an old drug. *Cardiovasc Res.* 2019;115(3):625–36.

76. Pithadia AB, Panchal SS, Patel DJ. Neuroprotective effects of potassium channel openers on cerebral ischemia–reperfusion injury in diabetic rats. *Bull Fac Pharmacy, Cairo Univ.* 2017;55(1):95–100.
77. Semenza GL. Surviving ischemia: adaptive responses mediated by hypoxia-inducible factor 1. *J Clin Invest.* 2000;106(7):809–12.
78. Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, Évora P, Castro-e-Silva O. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies. *Int J Mol Sci.* 2019;20(20):5034.
79. Kozak A, Ergul A, El-Remessy AB, Johnson MH, Machado LS, Elewa HF, et al. Candesartan augments ischemia-induced proangiogenic state and results in sustained improvement after stroke. *Stroke.* 2009;40(5):1870–6.
80. Yücel A, Aydogan MS, Ucar M, Sarıcı KB, Karaaslan MG. Effects of apocynin on liver ischemia-reperfusion injury in rats. In: *Transplantation Proceedings.* Elsevier; 2019. p. 1180–3.
81. Strome M, Wu J, Strome S, Brodsky G. A comparison of preservation techniques in a vascularized rat laryngeal transplant model. *Laryngoscope.* 1994;104(6):666–8.
82. Schneeberger S, Amberger A, Mandl J, Hautz T, Renz O, Obrist P, et al. Cold ischemia contributes to the development of chronic rejection and mitochondrial injury after cardiac transplantation. *Transpl Int.* 2010;23(12):1282–92.
83. Rice-Evans C. Screening of phenolics and flavonoids for antioxidant activity. In: *Antioxidant food supplements in human health.* Elsevier; 1999. p. 239–53.
84. Heffner JE, Repine JE. Pulmonary strategies of antioxidant defense 1. *Am Rev Respir Dis.* 1989;140(2):531–54.
85. Erel O. A novel automated direct measurement method for total antioxidant capacity using a new generation, more stable ABTS radical cation. *Clin Biochem.* 2004;37(4):277–85.
86. Kehrer JP, Klotz LO. Free radicals and related reactive species as mediators of tissue injury and disease: implications for health. *Crit Rev Toxicol.* 2015;45(9):765–98.
87. Sánchez C. Reactive oxygen species and antioxidant properties from mushrooms. *Synth Syst Biotechnol.* 2017;2(1):13–22.
88. Erel O. A new automated colorimetric method for measuring total oxidant status. *Clin Biochem.* 2005;38(12):1103–11.
89. McCord JM, Fridovich I. Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J Biol Chem.* 1969;244(22):6049–55.

90. Ighodaro OM, Akinloye OA. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria J Med.* 2018;54(4):287–93.
91. Limón-Pacheco J, Gonsebatt ME. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. *Mutat Res Toxicol Environ Mutagen.* 2009;674(1–2):137–47.
92. Sen CK, Packer L. Thiol homeostasis and supplements in physical exercise. *Am J Clin Nutr.* 2000;72(2):653S–669S.
93. Arai M, Imai H, Koumura T, Yoshida M, Emoto K, Umeda M, et al. Mitochondrial phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase plays a major role in preventing oxidative injury to cells. *J Biol Chem.* 1999;274(8):4924–33.
94. Chan AC, Tran K, Raynor T, Ganz PR, Chow CK. Regeneration of vitamin E in human platelets. *J Biol Chem.* 1991;266(26):17290–5.
95. Johnston CS, Meyer CG, Srilakshmi JC. Vitamin C elevates red blood cell glutathione in healthy adults. *Am J Clin Nutr.* 1993;58(1):103–5.
96. Imae M, Asano T, Murakami S. Potential role of taurine in the prevention of diabetes and metabolic syndrome. *Amino Acids.* 2014;46:81–8.
97. Wajant H, Pfizenmaier K, Scheurich P. Tumor necrosis factor signaling. *Cell Death Differ.* 2003;10(1):45–65.
98. Oeckinghaus A, Ghosh S. The NF- κ B family of transcription factors and its regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2009;1(4):a000034.
99. OFFLINE S. Janeway's Immunobiology.
100. Liu T, Zhang L, Joo D, Sun SC. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduct Target Ther.* 2017;2(1):1–9.
101. Mosser DM, Zhang X. Interleukin-10: new perspectives on an old cytokine. *Immunol Rev.* 2008;226(1):205–18.
102. Ouyang W, Rutz S, Crellin NK, Valdez PA, Hymowitz SG. Regulation and functions of the IL-10 family of cytokines in inflammation and disease. *Annu Rev Immunol.* 2011;29:71–109.
103. Cao S, Zhang X, Edwards JP, Mosser DM. NF- κ B1 (p50) homodimers differentially regulate pro-and anti-inflammatory cytokines in macrophages. *J Biol Chem.* 2006;281(36):26041–50.
104. Kim H, Rafiuddin-Shah M, Tu HC, Jeffers JR, Zambetti GP, Hsieh JJD, et al. Hierarchical regulation of mitochondrion-dependent apoptosis by BCL-2

- subfamilies. *Nat Cell Biol.* 2006;8(12):1348–58.
105. Lindsay J, Degli Esposti M, Gilmore AP. Bcl-2 proteins and mitochondria—specificity in membrane targeting for death. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Molecular Cell Res.* 2011;1813(4):532–9.
 106. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol cell Biol.* 2014;15(1):49–63.
 107. Mikkelsen TS, Toft P. The correlation between creatine kinase and myoglobin in critical ill patients with rhabdomyolysis. *Crit Care.* 2004;8(Suppl 1):P155.
 108. Ozer K, Rojas-Pena A, Mendias CL, Bryner BS, Toomasian C, Bartlett RH. The effect of ex situ perfusion in a swine limb vascularized composite tissue allograft on survival up to 24 hours. *J Hand Surg Am.* 2016;41(1):3–12.
 109. Bae M, Chung SW, Lee CW, Choi J, Song S, Kim S pil. Upper limb ischemia: clinical experiences of acute and chronic upper limb ischemia in a single center. *Korean J Thorac Cardiovasc Surg.* 2015;48(4):246.
 110. Lakunina VA, Burnysheva KM, Mitkevich VA, Makarov AA, Petrushanko IY. Changes in the receptor function of Na, K-ATPase during hypoxia and ischemia. *Mol Biol.* 2017;51:148–54.
 111. Kim MS, Akera T. O₂ free radicals: cause of ischemia-reperfusion injury to cardiac Na⁺-K⁺-ATPase. *Am J Physiol Circ Physiol.* 1987;252(2):H252–7.
 112. Belzer FO, Ashby BS, Gulyassy PF, Powell M. Successful seventeen-hour preservation and transplantation of human-cadaver kidney. *N Engl J Med.* 1968;278(11):608–10.
 113. Carocho M, Ferreira ICFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. *Food Chem Toxicol.* 2013;51:15–25.
 114. Borel JF, Feurer C, Magnee C, Stähelin H. Effects of the new anti-lymphocytic peptide cyclosporin A in animals. *Immunology.* 1977;32(6):1017.
 115. Gok E, Kubiak CA, Guy E, Ponder M, Hoenerhoff MJ, Rojas-Pena A, et al. Long-term effects of hypothermic ex situ perfusion on skeletal muscle metabolism, structure, and force generation after transplantation. *Transplantation.* 2019;103(10):2105–12.
 116. Carrel A, Lindbergh CA. The culture of whole organs. *Science (80-).* 1935;81(2112):621–3.
 117. Starzl TE, Groth CG, Brettschneider L, Moon JB, Fulginiti VA, Cotton EK, et al. Extended survival in 3 cases of orthotopic homotransplantation of the

- human liver. *Surgery*. 1968;63(4):549.
118. Guarrera J V, Henry SD, Samstein B, Odeh-Ramadan R, Kinkhabwala M, Goldstein MJ, et al. Hypothermic machine preservation in human liver transplantation: the first clinical series. *Am J Transplant*. 2010;10(2):372–81.
 119. Guarrera J V, Henry SD, Samstein B, Reznik E, Musat C, Lukose TI, et al. Hypothermic machine preservation facilitates successful transplantation of “orphan” extended criteria donor livers. *Am J Transplant*. 2015;15(1):161–9.
 120. Ravikumar R, Jassem W, Mergental H, Heaton N, Mirza D, Perera MTPR, et al. Liver transplantation after ex vivo normothermic machine preservation: a phase 1 (first-in-man) clinical trial. *Am J Transplant*. 2016;16(6):1779–87.
 121. Bral M, Gala-Lopez B, Bigam D, Kneteman N, Malcolm A, Livingstone S, et al. Preliminary single-center Canadian experience of human normothermic ex vivo liver perfusion: results of a clinical trial. *Am J Transplant*. 2017;17(4):1071–80.
 122. Baker H. Normothermic machine perfusion preservation for donor livers. ELSEVIER INC 525 B STREET, STE 1900, SAN DIEGO, CA 92101-4495 USA; 2022.
 123. Araki J, Sakai H, Takeuchi D, Kagaya Y, Tashiro K, Naito M, et al. Normothermic preservation of the rat hind limb with artificial oxygen-carrying hemoglobin vesicles. *Transplantation*. 2015;99(4):687–92.
 124. Haug V, Kollar B, Endo Y, Kadakia N, Veeramani A, Kauke M, et al. Comparison of acellular solutions for ex-situ perfusion of amputated limbs. *Mil Med*. 2020;185(11–12):e2004–12.
 125. Haberal M, Kirnap M, Erdem SR, Ozdemir BH, Lux KM, Bacanli D. Evaluation of New Baskent University Preservation Solution for kidney graft during cold ischemia: preliminary experimental animal study. *Exp Clin Transpl*. 2019;17(3):287–97.
 126. Burlage LC, Tessier SN, Etra JW, Uygun K, Brandacher G. Advances in machine perfusion, organ preservation, and cryobiology: potential impact on VCA. *Curr Opin Organ Transplant*. 2018;23(5):561.
 127. RL M, HA P, Shorey W, Schneewind J, BEATTIE Jr EF. TREATMENT OF "TOXEMIA" AFTER EXTREMITY REPLANTATION. *Arch Surg (Chicago, Ill 1960)*. 1964;89:871–9.
 128. Ghiselli A, Serafini M, Natella F, Scaccini C. Total antioxidant capacity as a tool to assess redox status: critical view and experimental data. *Free Radic Biol Med*. 2000;29(11):1106–14.
 129. Erer D, Dursun A, Oktar G, Iriz E, Zor M, Elmas Ç, et al. The effects of iloprost on lung injury induced by skeletal muscle ischemia-reperfusion.

BRATISLAVA Med JOURNAL-BRATISLAVSKE Lek List. 2014;115(7).

130. Küçük A, Polat Y, Kılıçarslan A, Süngü N, Kartal H, Dursun AD, et al. Irisin protects against hind limb ischemia reperfusion injury. *Drug Des Devel Ther.* 2021;361–8.
131. Afolabi OA, Alabi BA, Ajike RA, Oyekunle OS, Adegoke W, Ojetola AA. Evaluation of testicular torsion management in Ogbomoso, South-Western Nigeria and surgical detorsion-augmented treatment with phytochemical fractions of *Corchorus olitorius* leaf in experimental rats. *Saudi J Biol Sci.* 2023;30(1):103495.
132. Hosseinzadeh H, Taiari S, Nassiri-Asl M. Effect of thymoquinone, a constituent of *Nigella sativa* L., on ischemia–reperfusion in rat skeletal muscle. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2012;385:503–8.
133. Li M, Zhang Y, Zhou J, Liu H. Selenoprotein F Knockout Caused Glucose Metabolism Disorder in Young Mice by Disrupting Redox Homeostasis. *Antioxidants.* 2022;11(11):2105.
134. Chen B, Tang L. Protective effects of catalase on retinal ischemia/reperfusion injury in rats. *Exp Eye Res.* 2011;93(5):599–606.
135. Doroshov JH, Locker GY, Myers CE. Enzymatic defenses of the mouse heart against reactive oxygen metabolites: alterations produced by doxorubicin. *J Clin Invest.* 1980;65(1):128–35.
136. Knight KR, Messina A, Hurley J V, Zhang B, Morrison WA, Stewart AG. Muscle cells become necrotic rather than apoptotic during reperfusion of ischaemic skeletal muscle. *Int J Exp Pathol.* 1999;80(3):169–75.
137. Ferrer I, Pozas E, Lopez E, Ballabriga J. Bcl-2, Bax and Bcl-x expression following hypoxia-ischemia in the infant rat brain. *Acta Neuropathol.* 1997;94:583–9.
138. Cogswell AM, Stevens RJ, Hood DA. Properties of skeletal muscle mitochondria isolated from subsarcolemmal and intermyofibrillar regions. *Am J Physiol Physiol.* 1993;264(2):C383–9.
139. Crochemore C, Mekki M, Corbière C, Karoui A, Noël R, Vendeville C, et al. Subsarcolemmal and interfibrillar mitochondria display distinct superoxide production profiles. *Free Radic Res.* 2015;49(3):331–7.
140. Yurtal Z, Ozkan H, Kutlu T, Deveci MZY, Urfali B, Urfali S. The Matrix Metalloproteinase Inhibitor Batimastat Reduces Epidural Fibrosis After Laminectomy in Rats. *Turk Neurosurg.* 2023;33(1).
141. Ozturk H, Ozturk H, Terzi EH, Bugdayci G, Duran A. Interleukin 10 reduces testicular damage in experimental testicular ischemia/reperfusion injury. *Urology.* 2014;83(2):508-e1.

142. Wan X, Huang WJ, Chen W, Xie HG, Wei P, Chen X, et al. IL-10 deficiency increases renal ischemia-reperfusion injury. *Nephron Exp Nephrol.* 2014;128(1–2):37–45.
143. Xiang Y, Ye S, Cai C, Chen J, Zhao X, Zhu N, et al. Salvianolic acid attenuates limb ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle of rats. *Biomed Pharmacother.* 2018;97:551–6.
144. Xue B, Chen B, Tang Y, Weng C, Lin L. Dexmedetomidine protects against lung injury induced by limb ischemia-reperfusion via the TLR4/MyD88/NF- κ B pathway. *Kaohsiung J Med Sci.* 2019;35(11):672–8.
145. Yassin MMI, Harkin DW, D'Sa AAB, Halliday MI, Rowlands BJ. Lower limb ischemia-reperfusion injury triggers a systemic inflammatory response and multiple organ dysfunction. *World J Surg.* 2002;26(1):115.
146. Fagundes C, Fuchs FD, Fagundes A, Poerschke RA, Vacaro MZ. Prognostic factors for amputation or death in patients submitted to vascular surgery for acute limb ischemia. *Vasc Health Risk Manag.* 2005;1(4):345–9.